

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**Asma y proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS):
Evaluación del papel de SOCS3 en la regulación del asma y su aplicación como nueva diana
terapéutica para el control del asma**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Paz Zafra Martín

Directora

Victoria del Pozo Abejón

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**ASMA Y PROTEÍNAS SUPRESORAS DE LA SEÑALIZACIÓN DE
CITOCINAS (SOCS): EVALUACIÓN DEL PAPEL DE SOCS3 EN LA
REGULACIÓN DEL ASMA Y SU APLICACIÓN COMO NUEVA DIANA
TERAPÉUTICA PARA EL CONTROL DEL ASMA**

M^a Paz Zafra Martín

Madrid, 2014

Este trabajo ha sido realizado en el IIS-Fundación Jiménez Díaz en el Departamento de Inmunología bajo la dirección de la Dra. Victoria del Pozo Abejón, con la ayuda de una beca de la Fundación Conchita Rábago.

Doña M^a Victoria del Pozo Abejón, Doctora en Ciencias Biológicas y Adjunta del Departamento de Inmunología del IIS-Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICA:

Que **Doña M^a Paz Zafra Martín**, Licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado **“Asma y proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS): Evaluación del papel de SOCS3 en la regulación del asma y su aplicación como nueva diana terapéutica para el control del asma”**, y que una vez revisado, reúne todos los requisitos exigidos de calidad y originalidad para optar al grado de Doctora.

En Madrid, a 3 de Junio de 2014

Fdo. Dra. M^a Victoria del Pozo Abejón

Todo fluye -*Panta Rhei*-

Heráclito

A mis abuelos, con todo mi cariño.

AGRADECIMIENTOS

Este es el apartado más importante para mí y por eso he querido situarlo en primer lugar, todos los que aquí aparecéis habéis contribuido de alguna manera, ya sea intelectual o emocionalmente, a que esta tesis se realice. La Fundación ha sido un sitio genial en el que trabajar, el compañerismo y la predisposición a ayudar han sido pilares sobre los que esta tesis se ha construido. Me llevo amigos para siempre. Mil gracias.

Gracias a la Dra. Del Pozo por confiar en mí para llevar a cabo este trabajo. Han sido cuatro años de continuos retos, en los que tu supervisión ha sido muy crítica a la vez que necesaria. Me has ayudado a madurar muchísimo en el ámbito científico, además me llevo unos estupendos recuerdos de nuestros congresos juntas. Gracias Vito.

Gracias a mi labo, por crear esa unión tan especial y hacer mi día a día más llevadero. A Esther, por enseñarme quién era SOCS, y aportar siempre serenidad. A Bea, esa currante abnegada, tu capacidad de trabajo ha sido un ejemplo para mí y, sin tí, mis inicios hubiesen sido mucho más desastrosos de lo que fueron. A Cristi, por tu alegría y tu empeño en hacerme entender tu trabajo, eres muy didáctica tía. Has sido un apoyo muy importante y de alguna manera siento que hemos recorrido un camino paralelo juntas. A Vero, porque es la mejor técnico del mundo, y me encanta tu capacidad crítica, estás preparada para lo que te venga porque eres increíble. A Laura, fuiste un apoyo muy importante en un momento determinado y eres parte del club de la esofagitis, gracias. A Ana, por ser mi mano derecha en el animalario, hemos trabajado duro codo con codo y siempre te estaré muy agradecida por todo lo que has hecho. Y por último, a Carla, por tu dulzura, tu sosiego, tu intuición y tu fantástica capacidad de análisis, además para mí, sin lugar a dudas, eres la reina de la microscopía.

Este trabajo ha sido fruto de una sinergia entre el laboratorio y los diferentes servicios de Alergología que han participado activamente al reclutamiento de pacientes. Gracias al servicio de Alergología de la Fundación Jiménez Díaz, es muy fácil trabajar con vosotros y habéis sido piezas claves para el desarrollo del proyecto. Gracias al Dr. Sastre y a su equipo de médicos adjuntos, especialmente a Mar, tantas llamadas matutinas, has sido fundamental para que este trabajo se lleve a cabo. Gracias a las resis, Mónica, Lourdes, Vicky, Maru, Pamela, Silvia y Elisa; y gracias a Erica y Manoli, sois unas trabajadoras excepcionales. Gracias al servicio de Alergología de la Paz, encabezado por el Dr. Quirce, trabajáis mucho y muy bien, el estudio sobre la esofagitis eosinofílica es una prueba de ello. Gracias al servicio de Alergología del Niño Jesús, a la Dra. Ibáñez y en especial a Pablo, por su interés y participación en el trabajo de la esofagitis. Por último, quiero agradecer al Dr. Zubeldia jefe de servicio de Alergología del Gregorio Marañón, el haber realizado las pruebas de pletismografía corporal a los ratones.

El estudio en ratones ha sido realizado, en parte, en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares bajo la supervisión del Dr. Ruiz-Cabello. Mi corta estancia en este centro fue muy enriquecedora, y estoy muy agradecida por ello. Gracias Izaskun, tu capacidad de trabajo y tus ganas de aprender no tienen límites, pasamos muchas horas juntas en el animalario y he aprendido

mucho de ti. Gracias Marina, de tu mano conocí el animalario y sin tí, el estudio no hubiera sido posible. Gracias al resto del labo, especialmente a Bea y a Juan.

Gracias al labo 2, siempre estáis ahí para ayudar con cualquier cosa. Gracias a la Dra. Cárdbaba, Blanca tus correcciones han sido muy buenas y te estoy muy agradecida, a Miriam, Jose Manuel, Sole, David y Selene. Y luego está el labo 4, os admiro, por vuestra forma de trabajar y por hacerme sentir una más. Aroa, qué te voy a decir, somos de poco hablar, eres una pasada. Un beso para Vero y Lucas. Irene, gracias por esas cañas que nos sacaban de los bucles horribles y por tu necesaria ironía. Gracias a Vivanco, Gloria, Charly, Fer, Marta (-Qué haces por aquí todavía! -Y tú?), Laura y María.

Los agradecimientos se extienden fuera de los dominios de inmuno. Gracias a los chicos de metabolismo óseo, en primer lugar a Martita, Ana y Adela, ¡cuántas confianzas nanodroperas chicas! y, en segundo lugar, al bando masculino, a Dani, tus abrazos siempre reconfortan, Juanan y Sergio. Gracias a los de reuma, a mi Jessy, has sido un apoyo fundamental, te echo muchísimo de menos y te quiero a rabiar, a Iván, Ane, Sandra, Juan, Marta y Amanda. Gracias a los de neumó, Sandra, Raúl y Alvaro, siempre habéis estado dispuestos a echar una mano y se agradece.

Gracias a nefro, a Beñat que me dio la llave para entrar en el “gran” laboratorio. Gracias a Cernest, nuestros momentos de bioquímicos alterados no tienen precio, y por ende, a Ana, siempre sabes sacarme una sonrisa cuando las cosas no van bien. A Belén, tengo que agradecerte muchas cosas, lo sabes, además eres una de las personas más generosas que conozco. Gracias a mis niños Cristian y Carliños, a Alberto, Álvaro, Conchi, Carlota, Ainhoa, Iolanda, Cris, Julio ¡la instalación del Quantity One fue vital! y Tarin, que buen pulso tienes. Gracias a Ana, nos hemos peleado mucho con el citómetro juntas, brrrr...Y gracias a Juan, Jose Luis, Carmen y Luis, sois estupendos.

Gracias a los chicos de anatomía patológica, sobre todo a Raúl, pero también a Sandra y el Dr. Rojo, y especialmente al Dr. Manzarbeitia por ayudarnos con las tinciones.

Gracias al equipo animalario, Pilar, Juani y Carlos, me habéis hecho mucha compañía durante los largos días por allí arriba. Y gracias, a Flor, Pilar e Isabel por vuestro cariño continuo y a Carmen, porque siempre nos sacas alguna sonrisa.

No me puedo olvidar de mi paso previo por el Centro de Investigaciones Biológicas, aquéllos años fueron los que sembraron en mí, el interés por la ciencia. Gracias al Dr. Rojo, gracias Jose Mari por darme la oportunidad de conocer a ICOS y por querer siempre lo mejor para mí. Gracias a Jenny, Ilaria, Marisa, Gloria, Pilar y Sandra. Y por supuesto, gracias a la comuna CIBera, el ambiente que se crea en el centro es debido a personas como vosotros, sois todos increíbles. Kris, qué te voy a decir, me has ayudado siempre en que te lo he pedido, se te echa muchísimo de menos, Mikel ¡eres la persona más maja del mundo! y la Noe también. Gracias a Lu, Eva, Virgi, Luci y la Dra. Botella, formáis un super labo. Gracias a mi Rodri, a Virgi, Kike, Carol, Asier, Isa, Fernando y Carlos, tantas

y tantas cañas vividas ¡y las que nos quedan! Y finalmente gracias a Ángela y Cris, mis vecinas de labo más especiales, ¡ay qué tiempos!

En el camino, han sido un apoyo indiscutible todas mis amigas, me habéis animado en los momentos duros y sois importantísimas en cada paso que doy. Gracias a mis chicas del barrio, Cori y Mari, sois como las hermanas que nunca tuve, Marta, María, Laurita y Flavia ¡siempre estáis ahí! Gracias a las de Ruiseñá, Patri, Paula, Isa, Sofi y Sarita, porque sois estrambóticamente geniales. Gracias a mis biólogas, Barby, las Natis, Lola, Sara y Gloria, cada quedada nuestra es una inyección de energía.

De mi paso estudiantil, quiero acordarme de cuatro personas muy importantes para mí, a la hora de superar la licenciatura de Bioquímica, gracias a Javi, Dani, César y Jorge, vuestra inteligencia es de admirar.

Dejo para el final mi agradecimiento infinito a la gente que me “aguanta” día a día: mi familia. En primer lugar, gracias a mis padres, si a día de hoy soy algo, es por vosotros. Me habéis dado una educación inmejorable y sobre todo me habéis aportado mucha ilusión y curiosidad, gracias a nuestros viajes, bailes, canciones, libros, películas, tertulias.... que hemos compartido juntos y que han hecho de mí una mejor persona, os quiero mucho. Gracias a esa persona que es mi alegría diaria, mi hermano Edu, tu cariño constante ha sido muy importante para superar muchos baches malos, te quiero chiquitín. Gracias a mis tíos Maribel y Juan, títos, mi educación también ha recaído en vosotros, mi imaginación se ha enriquecido de cuentos, música, juegos... que vosotros compartisteis conmigo, os quiero.

Y por último un gracias enorme a Alfonso, sí, tú eres de mi familia también. Entraste en mi vida de casualidad y ahora me pregunto qué demonios haría sin ti. Eres mi compañero de viaje, el que me conoce mejor que nadie. Es genial comprobar que nuestras ilusiones son las mismas. En estos años ha sido increíble tu implicación con mi trabajo y sabes que esta tesis está impregnada de pichicositas. Siempre te agradeceré el apoyo incondicional que me das, te quiero.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad crónica de las vías respiratorias, caracterizada por la presencia de un infiltrado inflamatorio, que conduce a la obstrucción variable del flujo aéreo, la hiperrespuesta de las vías y el remodelado de la pared bronquial. Estos procesos aumentan la irritabilidad sensorial y la secreción de moco, así como los episodios recurrentes de sibilancias, y producen disnea, opresión torácica y tos. La evidencia de que el asma es una enfermedad inflamatoria deriva de la presencia en las vías respiratorias principalmente de eosinófilos, mastocitos y linfocitos T, pero también de células dendríticas, macrófagos y neutrófilos.

Actualmente, la enfermedad afecta a más de 300 millones de personas en el mundo, con cerca de 250.000 muertes anuales. Su prevalencia aumenta cada año, principalmente en los países occidentales, constituyendo en éstos la enfermedad crónica más común de la infancia.

La enfermedad asmática se orchestra mediante la respuesta inmune de tipo 2 (Th2), típica en enfermedades inflamatorias de tipo alérgico, entre las que también se incluyen la rinitis alérgica, la dermatitis atópica o la esofagitis eosinofílica. Uno de los tipos celulares principales en este tipo de respuesta inmune es el eosinófilo, de carácter multifuncional gracias a la producción de una serie de citocinas inmunorreguladoras que desempeñan funciones de forma activa en la regulación de la respuesta inmune de tipo 2. De todas las citocinas liberadas por los eosinófilos y otras células como los linfocitos T cabe destacar la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 en las respuestas de tipo 2, que van a activar diferentes rutas de señalización .

Tanto la magnitud como la duración de la activación de las rutas de señalización, deben estar sometidas a un estricto control. En este sentido, existen sistemas de regulación negativa de la señalización esenciales para la homeostasis de los procesos inmunológicos como es el caso de la familia de proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS). De todos los miembros que componen esta familia, SOCS3 ha sido relacionado de forma positiva con la gravedad de varias enfermedades alérgicas como el asma y la dermatitis atópica. El aumento de expresión de SOCS3 promueve dichas respuestas alérgicas inhibiendo el desarrollo hacia un fenotipo de tipo 1 y promoviendo el de tipo 2 en los linfocitos T y otras células.

En los últimos años ha existido un estancamiento en la aparición de nuevas terapias eficaces para combatir enfermedades alérgicas. Es el caso del asma, que a pesar del incuestionable progreso

alcanzado en lo que se refiere al mecanismo de la enfermedad y el establecimiento de fenotipos subyacentes, el tratamiento actual sigue consistiendo en el uso de anti-inflamatorios sistémicos y poco específicos como los glucocorticoides en combinación con broncodilatadores y antihistamínicos.

En general, estos fármacos controlan eficazmente los síntomas en la mayoría de los pacientes, pero sigue existiendo un gran número de pacientes refractarios a éstas terapias, lo que ha hecho necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, entre las que se incluyen la inmunoterapia o el uso de inhibidores específicos o anticuerpos frente a mediadores del proceso alérgico.

A pesar de los avances, un gran número de pacientes sigue sin responder a estas terapias lo que hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

La terapia génica se presenta como una alternativa dirigida hacia una diana concreta, cuyo efecto es potencialmente local y duradero. El bloqueo de una función biológica a través de la represión de la actividad transcripcional es más eficiente que la inhibición de una determinada proteína, puesto que a partir de una sola molécula de ARN mensajero se generan múltiples copias de una proteína específica. Uno de los mecanismos más utilizados como terapia génica es el silenciamiento génico que reduce y regula la concentración de ARN mensajero dentro de la célula y por lo tanto, la formación de una proteína.

OBJETIVOS

El presente estudio tiene como objetivo principal analizar la función de SOCS3 en la enfermedad asmática. Inicialmente se estudia en un modelo de asma crónica inicial a partir del análisis obtenido mediante el perfil de expresión génica en pulmones. Además se evalúa la función de SOCS3 y su regulación en pacientes con tres enfermedades Th2 caracterizadas por presentar un abundante infiltrado eosinofílico, bien en los pulmones como es el caso del asma y la bronquitis eosinofílica no-asmática bien en el esófago como ocurre en los pacientes con esofagitis eosinofílica. Por último, se pretende evaluar el potencial terapéutico del silenciamiento de SOCS3 en un modelo animal de asma alérgica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos modelos animales de asma alérgica crónica sensibilizados al antígeno ovalbúmina. En el primero, se utilizaron un total de 60 ratones divididos en cuatro grupos: control negativo (SS), control positivo (OVA), tratados con el plásmido vacío (OVA pEGFP) y tratados con el plásmido con galectina-3 (OVA pEGFP-GAL-3).

Transcurridas doce semanas los animales fueron sacrificados y se extrajo el ARN de los pulmones para analizar el perfil de expresión en los diferentes grupos mediante la técnica de los microarrays.

Además se llevaron a cabo una serie de inmunohistoquímicas y PCR cuantitativas para confirmar los resultados.

Para acometer el segundo modelo animal de asma crónica alérgica se emplearon un 68 ratones divididos en los siguientes cuatro grupos de experimentación: control negativo (SS), control positivo (OVA), tratado con un ARNsi control negativo (OVA ARNsi C-) y tratado con ARNsi de SOCS3 (OVA ARNsi SOCS3).

Para comprobar la eficacia del tratamiento *in vivo* se realizaron las siguientes técnicas: pletismografía corporal para analizar la hiperrespuesta de las vías respiratorias, tomografía de fluorescencia molecular y tomografía computarizada para evaluar el grado de inflamación y obstrucción pulmonar.

Transcurridas 9 semanas se sacrificaron los animales y se llevaron a cabo una serie de experimentos *in vitro* para completar el estudio, entre los que se incluyen: citometría de flujo a partir de las células extraídas de los lavados broncoalveolares y tinciones de hematoxilina/eosina en los cortes de pulmón para analizar el grado de infiltración, tinción tricrómica de Masson y Alcian Blue/PAS para evaluar los depósitos de colágeno y moco respectivamente, cuantificación de citocinas por PCR cuantitativa, enzoinmunoensayos para analizar la respuesta humoral y western blot de proteínas implicadas en las vías de señalización JAK/STAT y Rho/ROCK. Finalmente se evaluó la expresión de micro ARNs (ARNmi) mediante la técnica de los microarrays a partir del ARNmi extraído de los pulmones de los ratones.

Por otro lado se evaluó la expresión de SOCS en pacientes con tres enfermedades Th2 como el asma (n=6), la esofagitis eosinofílica (EoE, n=25) y la bronquitis eosinofílica no-asmática (BENA, n=8), así como en controles sanos (n=9). Se purificaron los eosinófilos de sangre periférica y se midió por PCR cuantitativa la expresión de SOCS3 y SOCS5. En el caso de la EoE se amplió el estudio evaluando la expresión de SOCS3 y otros factores implicados en la respuesta Th2 en biopsias de esófago de los pacientes y en controles sin la enfermedad (n=17).

Además en los eosinófilos purificados de sangre humana, se estudió la regulación de SOCS3 por citocinas Th2 y PGE₂ mediante PCR cuantitativa y se analizó la función de SOCS3 en eosinófilos de pacientes asmáticos (n=36) mediante la herramienta de silenciamiento génico. Para ello, los eosinófilos purificados se incubaron con ARNsi de SOCS3 o con ARNsi control negativo y se cuantificaron diversos factores y citocinas por PCR cuantitativa. Además se evaluaron acciones típicas de los eosinófilos como la migración, la adhesión y la degranulación y el estado de activación de las vías de señalización JAK/STAT y MAPK/ERK.

RESULTADOS

El análisis del perfil de expresión en los pulmones de los ratones con asma crónica y en los tratados con galectina-3 (Gal-3) puso de manifiesto la complejidad de la enfermedad revelando una serie de funciones biológicas afectadas en las que participaban una gran cantidad de genes. De todos los

genes alterados en la respuesta asmática que modificaron su expresión debido a la terapia génica con Gal-3, se eligió al grupo de genes que forman parte de la familia de supresores de la señalización de citocinas (SOCS). La medida de SOCS3 y SOCS1 por PCR cuantitativa confirmó los resultados obtenidos por microarrays.

El impacto de la terapia con gal-3 en la expresión de SOCS3 se corroboró por análisis inmunohistoquímico de los cortes de pulmón, observándose una drástica reducción de la acumulación de células que expresaban SOCS3 en las zonas inflamadas del pulmón.

A continuación, se quiso evaluar la expresión de SOCS3 en humanos y se incluyeron, además de pacientes con asma, otras dos enfermedades Th2 que también cursan con abundantes infiltrados eosinófilos, la BENA y la EoE. La expresión de SOCS3 medida en eosinófilos purificados de sangre periférica de pacientes con asma y BENA, era superior que la obtenida en los eosinófilos de los voluntarios sanos. En los pacientes con EoE, la expresión de SOCS3 era elevada en las biopsias de esófago analizadas, así como de SOCS1, IL-5, IL-13, CCR3 y eotaxina-3. En cambio, no se encontraron diferencias significativas en eosinófilos purificados de sangre periférica de los pacientes con EoE, ni de SOCS3, ni de SOCS1, en comparación con los sujetos control, sin embargo, la eosinofilia en sangre periférica correlacionaba positivamente con la expresión de SOCS3 en el esófago. Además, en estos pacientes se encontró una activación constitutiva de ERK determinada tanto a nivel génico como proteico en las biopsias de esófago. La dieta de eliminación de seis alimentos, de conocida alta carga alergénica, efectuada en cinco de los pacientes con EoE redujo los niveles de SOCS3 en el esófago a la vez que mejoró la sintomatología de los pacientes.

La regulación de SOCS3 fue investigada con detalle en los eosinófilos humanos purificados de sangre periférica, mediante el análisis de los niveles de ARNm de SOCS3. Las citocinas Th2, IL-4, IL-5 e IL-13 y la prostaglandina PGE₂ aumentaban la expresión de SOCS3 de forma dosis y tiempo dependiente en los eosinófilos.

La importancia de SOCS3 en las enfermedades Th2 y particularmente en el asma se evaluó y a través del silenciamiento génico de su expresión en eosinófilos purificados de pacientes con dicha enfermedad. La eliminación casi completa de la proteína de SOCS3 revierte el efecto del supresor fomentando la degranulación citolítica en los eosinófilos al inhibirse tanto la migración como la capacidad de adhesión, ambas acciones necesarias para producirse la extravasación al foco inflamatorio. Esta pérdida de regulación es debida a una activación constitutiva de la vía JAK/STAT y la disminución de la expresión de los factores de la transcripción GATA-3 y FOXP3 que promovían un fenotipo regulador en los eosinófilos.

El último paso del estudio comprende el abordaje de un modelo animal de asma alérgica en el que se silencia la expresión de SOCS3 a nivel pulmonar mediante la administración intranasal del ARNsi. El tratamiento con ARNsi de SOCS3 restablece los niveles naturales del supresor, recuperando el control sobre la vía de señalización JAK/STAT y la activación de la respuesta Th2 a través de reducción de la concentración pulmonar de las citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17 y el

aumento en contraste de IL-10. Como resultado, la mayoría de los infiltrados eosinófilos en las vías respiratorias desaparecen, lo que ocasiona una disminución de la hiperrespuesta de las vías respiratorias, la hipersecreción de moco y los depósitos de colágeno, conduciendo, en conjunto, a la atenuación del proceso asmático en los ratones con asma alérgica inducida por OVA.

CONCLUSIONES

La reducción de los niveles de SOCS3 en el asma alérgica y otras patologías Th2 características como la bronquitis eosinofílica-no asmática (BENA) y la esofagitis eosinofílica (EoE), en las que también se encuentran elevados, es una buena aproximación terapéutica para el tratamiento de este tipo de enfermedades.

SUMMARY

INTRODUCTION

Asthma is a chronic airway disease characterized by inflammatory infiltrates that leads to variable airflow obstruction, airway hyperresponsiveness and bronchial wall remodeling. These processes increase irritability and mucus secretion, and cause recurrent episodes of wheezing, breathlessness, chest tightness, and coughing. The evidence that supports asthma as an inflammatory disease is the presence in the airways mainly of eosinophils, mastocytes and lymphocytes T, but also of dendritic cells, macrophages and neutrophils.

Nowadays, asthma affects 300 million people all over the world and causes nearly 250.000 deaths per year. In the same way, its prevalence increase every year, particularly in developed countries where asthma is the most common chronic disease.

Asthma, and other allergic inflammatory diseases as allergic rhinitis, atopic dermatitis or eosinophilic esophagitis, is orchestrated by the type 2 immune response (Th2). In Th2 immune responses, eosinophils play key roles due to their multifunctional nature. Eosinophils are terminally differentiated, nondividing cells, and tissue supplied comes only from blood circulation. Therefore, they have to migrate from the bloodstream into inflamed airways recruited by chemoattractants as eotaxins and IL-5. First, they start to roll along the endothelium, to establish a firmer adhesion on the endothelium because of the interaction of the integrins on eosinophils with adhesion molecules of the immunoglobulin family, and then eosinophils extravasate to the target tissue to exert their functions. Eosinophils have been traditionally been described as effector cells in asthma thanks to the capacity to release an array of products that damage the epithelium, induce mucus production and bronchoconstriction; however recent studies have revealed a more diverse role for eosinophils displaying a great variety of immunoregulatory regulatory roles as professional antigen presenting cells and as modulators of T CD4⁺ cells, dendritic cells, B cells, mast cells, neutrophils, and basophils. Eosinophils express a specific cytokine profile to carry out the regulation and polarization of these cells towards a new functional subtype; in allergic asthma, where Th2 responses are predominant, IL-4, IL-5 and IL-13 are the principal secreted cytokines. These cytokines bind to membrane receptors to activate complex signal transduction pathways.

Cytokines are one of the main soluble molecules that participate in the initiation, perpetuation, execution, and resolution of the inflammatory response. Therefore, tight control of cytokine production and function is required to prevent an imbalance in the magnitude, duration, and remission of the immune response. SOCS proteins are recognized as an important mechanism in the

negative regulation of several cytokine pathways. Among all SOCS members, SOCS3 expression has been positively correlated to an increase severity in some allergic diseases as asthma and atopic dermatitis. SOCS3 is predominantly expressed in Th2 cells and inhibits Th1 differentiation.

In the past years the treatment of allergic diseases has barely been modified and only a few new effective therapies have arisen. In the case of asthma, although there have been substantial advances in the understanding of the pathogenesis and natural course of the disease, current treatment is still based on the use of systemic or inhaled corticosteroids in combination with bronchodilators and antihistamines. These drugs control efficiently the symptoms in most asthma patients but the disease does not disappear, and other approaches have been developed recently like immunotherapy and specific inhibitors or antibodies against allergic mediators. Despite the progress, a big number of patients are non-responders to these new therapies so it is very important to continue searching for new therapeutic strategies.

Among all the possible new strategies, gene therapy is an alternative which targets a specific step leading to a locally and long-lasting effect.

Transcriptional activity repression is more efficiently than protein inhibition to block a biological function because with one messenger RNA molecule is possible to generate multiple protein copies. One of the mechanism more frequently used in gene therapy is gene silencing which is capable of reduce and regulate messenger RNA concentration in cells, and therefore protein levels. The intranasal administration of naked siRNA has opened new possibilities in drug delivery and respiratory therapy. We have developed a therapeutic approach in a murine model of chronic asthma by delivering SOCS3-siRNA intranasally.

OBJECTIVES

The main objective of the study is to analyze SOCS3 function in asthma. Firstly, a gene expression lung profile is obtained from mice with chronic asthma treated or not with galectin-3. Then, SOCS3 function and regulation is evaluated in patients with three different highly eosinophilic-Th2 diseases: asthma, non-asthmatic eosinophilic bronchitis (NAEB) and eosinophilic esophagitis (EoE). Finally, SOCS3 gene silencing by locally administered siRNA is tested in an allergic asthma mouse model to evaluate the therapeutic potential.

MATERIALS & METHODS

Two different OVA-induced asthma mouse models were carried out. The first one established four groups: negative control (SS), positive control (OVA), empty plasmid-treated (OVA pEGFP) and galectin-3 encoded plasmid-treated (OVA pEGFP-GAL-3). After 12 weeks animals were sacrificed and lungs were extracted to purify RNA and determine the expression profile among the four experimental groups by using microarray technology. Moreover, immunohistochemistry and quantitative PCR were performed to further confirm the results obtained by microarray technology.

The second asthma animal model was also divided into four groups: negative control (SS), positive control (OVA), siRNA negative control-treated (OVA C-siRNA) and SOCS3 siRNA-treated (OVA SOCS3 siRNA).

SOCS3 siRNA treatment efficiency was checked *in vivo* by body plethysmography, fluorescence molecular tomography and computerized tomography to evaluate airway responsiveness, inflammation and pulmonary obstruction respectively.

After 9 weeks animals were sacrificed. A wide range of *in vitro* techniques were performed to complete the study: flow cytometry of bronchoalveolar lavage cells and hematoxylin/eosin staining to evaluate infiltrates, Masson trichrome and Alcian Blue /PAS staining to analyze collagen and mucus deposits respectively, cytokine measurement by quantitative PCR, humoral response analyzed by ELISA and protein western blot to assess activation of signaling pathways. Finally, micro RNA expression profile in lungs was determined by microarray technique.

SOCS expression was evaluated in patients with three different Th2 diseases: asthma (n=69, eosinophilic esophagitis (EoE) (n=25) and non-asthmatic eosinophilic bronchitis (NAEB) (n=8), and also in nine healthy controls. Eosinophils were purified from peripheral blood and SOCS3 and SOCS5 expression were measured by quantitative PCR. Furthermore, EoE patients underwent a detailed study, and SOCS3 expression as well as other factors implicated in Th2 immune responses were analyzed in esophageal biopsies from subjects with (n=25) and without (n=17) the disease.

SOCS3 regulation by Th2 cytokines and PGE₂ in human purified eosinophils were analyzed by quantitative PCR, and SOCS3 function in eosinophils from asthmatic patients (n=36) were studied by gene silencing. Eosinophils were incubated with SOCS3 siRNA or a negative control siRNA, and after 48 hours different factors and cytokines were assessed by quantitative PCR and signaling pathway intermediates were studied by western blotting. Moreover, eosinophil migration, adhesion and degranulation were evaluated.

RESULTS

The analysis of gene biological function revealed gene enrichment in several pathways when comparing the OVA and pEGFP-Gal-3 groups. Interestingly, inflammatory response, leukocyte activation, and cytokine production processes presented a significant overexpression in mice from OVA group compared to mice treated with galectin-3 gene therapy. One of the pathways that underwent significant enrichment in OVA mice in comparison to the pEGFP-GAL-3 group were the processes implicated in negative regulation of inflammatory response. Prominent among this class of intracellular regulators are members of the SOCS family of proteins. Microarray data was confirmed by measuring SOCS1 and SOCS3 levels by quantitative PCR.

The impact of gal-3 therapy on SOCS3 was further confirmed by immunohistochemical analysis. Accumulation of SOCS3-expressing cells at the inflammatory site coincides with accumulation of inflammatory cells. In the mice treated with Gal-3, there was a correlation between non-SOCS3-expressing cells and the absence of inflammatory cells.

SOCS3 expression was then evaluated in patients with asthma, NAEB and EoE, which are three Th2-diseases characterized by eosinophilic infiltrates. SOCS3 expression was higher in eosinophils from NAEB and asthma patients than in healthy subjects. In the case of EoE patients, SOCS3 expression was found elevated in the esophageal biopsies analyzed, as well as SOCS1, IL-5, IL-13, CCR3 and eotaxin-3. However when SOCS3 and SOCS1 were determined in blood eosinophils we did not achieve significant differences in comparison with the control subjects, but a positive correlation was observed between blood eosinophils and SOCS3 esophageal expression. Moreover, in EoE patients ERK signaling was constitutively activated in the esophagus determined by quantitative PCR and western blot. Empiric 6-food elimination diet, in which the top food allergens were removed in five EoE patients, reduced SOCS3 mRNA levels in the esophagus at the same time that patients improved.

SOCS3 regulation was further studied in human blood eosinophils by quantitative PCR. IL-4, IL-5 and IL-13 and PGE₂ eosinophil stimulation increased SOCS3 mRNA levels in a time and dose dependent manner.

SOCS3 importance in Th2 diseases and particularly in asthma, was evaluated by gene silencing of blood eosinophils purified from asthma subjects. Almost complete SOCS3 protein elimination reversed the suppressor effect and promoted cytolytic degranulation in eosinophils and the inhibition of migration and adhesion capacity, actions which are essential in eosinophil extravasation to the tissue. The loss in regulation is due to a constitutively activation of the JAK/STAT signaling pathway, and a diminished GATA-3, FOXP3 and IL-10 expression. GATA-3 is the master transcription factor for Th2 cells and FOXP3 and IL-10 are mainly promoters of the regulatory phenotype in eosinophils.

Finally, SOCS3 levels were reduced in lungs by locally SOCS3 siRNA delivering into the mice lungs. SOCS3 siRNA treatment restored homeostatic suppressor levels in lungs. So control of the JAK/STAT signaling pathway and the Th2 response was regained through a pulmonary reduction of IL-4, IL-5, IL-13 and IL-17 cytokines at the same time IL-10 was augmented. Additionally, RhoA-ROCK kinase pathway was inhibited. As a result, eosinophil infiltrates in the airways nearly disappeared leading to diminution in airway hyperresponsiveness, mucus hypersecretion and collagen deposits. Airway inflammation was also evaluated *in vivo* by fluorescence molecular tomography and computerized tomography and SOCS3 gene silencing was effective in reducing cell infiltrates in mice lungs treated with SOCS3 siRNA. In combination, all these processes attenuated asthma progression in mice with OVA-induced allergic asthma.

CONCLUSIONS

Reduction of SOCS3 levels in allergic asthma and other Th2 pathologies with eosinophilia as NAEB and EoE in where SOCS3 expression is increased, is a suitable therapy to treat this kind of diseases.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS | I |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. LA RESPUESTA INMUNE DE TIPO 2..... | 3 |
| 1.1.1. Iniciación y propagación de la respuesta inmune de tipo 2 | 3 |
| 1.2. EL EOSINÓFILO: CÉLULA CARACTERÍSTICA DE LA RESPUESTA INMUNE DE TIPO 2 | 6 |
| 1.2.1. Funciones efectoras de los eosinófilos | 7 |
| 1.2.1.1. Liberación de las proteínas de los gránulos..... | 7 |
| 1.2.1.2. Expresión de receptores Fc | 7 |
| 1.2.1.3. Secreción de mediadores lipídicos y otras moléculas inflamatorias..... | 7 |
| 1.2.2. Funciones inmunorreguladoras..... | 8 |
| 1.2.2.1. Presentación antigénica | 8 |
| 1.2.2.2. Producción de citocinas y otras moléculas inmunomoduladoras | 8 |
| 1.2.3. Ciclo vital del eosinófilo | 11 |
| 1.3. ENFERMEDADES EOSINOFÍLICAS CON FENOTIPO Th2 | 13 |
| 1.3.1. Asma | 13 |
| 1.3.1.1. Factores que influyen en la aparición y el desarrollo de la enfermedad asmática | 14 |
| 1.3.1.2. Clasificación de los fenotipos asmáticos..... | 15 |
| 1.3.1.2.1. Fenotipos asmáticos Th2 | 16 |
| 1.3.1.2.2. Fenotipos asmáticos no –Th2 | 20 |
| 1.3.2. Bronquitis eosinofílica no – asmática | 21 |
| 1.3.2.1. Tratamiento | 21 |
| 1.3.3. Esofagitis eosinofílica..... | 21 |
| 1.3.3.1. Tratamiento | 23 |
| 1.4. SEÑALIZACIÓN DE CITOCINAS..... | 24 |
| 1.5. PROTEÍNAS SUPRESORAS DE LA SEÑALIZACIÓN DE CITOCINAS | 25 |
| 1.5.1. Estructura y mecanismo de supresión de las proteínas SOCS | 26 |
| 1.5.2. Regulación de los miembros de la familia SOCS | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 1.5.3. SOCS3 | 30 |
| 1.5.3.1. Función de SOCS3 en células inmunes | 30 |
| 1.5.3.1.1. SOCS3 en macrófagos y células dendríticas | 30 |
| 1.5.3.1.2. SOCS3 en células T cooperadoras..... | 31 |
| 1.6. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS: TERAPIA GÉNICA | 32 |
| 1.6.1. Silenciamiento génico | 33 |
| 1.6.1.1. Biogénesis y mecanismo de acción del ARN de interferencia..... | 33 |
| 1.6.1.2. Terapias de silenciamiento génico con ARNsi..... | 36 |
| 1.6.1.2.1. Administración pulmonar de ARNsi | 37 |
| 2. OBJETIVOS | 41 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 45 |
| 3.1. MODELOS ANIMALES..... | 47 |
| 3.1.1. Modelo de asma crónica 1: Tratamiento con galectina-3 | 47 |
| 3.1.2. Modelo de asma crónica 2: Terapia con el ARNsi de SOCS3..... | 48 |
| 3.2. SUJETOS DE ESTUDIO..... | 49 |
| 3.3. ENDOSCOPIAS Y OBTENCIÓN DE BIOPSIAS ESOFÁGICAS..... | 50 |
| 3.4. PURIFICACIÓN DE PBMC Y EOSINÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA | 51 |
| 3.5. CULTIVOS DE EOSINÓFILOS..... | 51 |
| 3.6. INMUNOCITOQUÍMICA DE EOSINÓFILOS | 52 |
| 3.7. INMUNOFLUORESCENCIA DE EOSINÓFILOS | 52 |
| 3.8. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE ARNsi DE SOCS3 EN EOSINÓFILOS PURIFICADOS | 52 |
| 3.9. CITOMETRÍA DE FLUJO DE EOSINÓFILOS | 53 |
| 3.10. ENSAYOS FUNCIONALES CON EOSINÓFILOS | 53 |
| 3.10.1. Migración..... | 53 |
| 3.10.2. Adhesión..... | 54 |
| 3.10.3. Degranulación..... | 54 |

| | |
|---|----|
| 3.11. ANÁLISIS DE LA INMUNIDAD HUMORAL | 54 |
| 3.11.1. Modelo animal | 54 |
| 3.11.1.2. Determinación de IgE total | 54 |
| 3.11.1.3. Determinación de IgE específica frente a OVA | 55 |
| 3.11.1.4. Determinación de IgG ₁ e IgG ₂ específicas frente a OVA | 55 |
| 3.11.2. Pacientes | 56 |
| 3.12. CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS EN SUERO Y SOBRENADANTES | 56 |
| 3.12.1. Array de citocinas | 56 |
| 3.12.2. Enzimoimmunoensayo (ELISA) | 57 |
| 3.13. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE DIVERSOS FACTORES Y CITOCINAS POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL | 57 |
| 3.13.1. Extracción de ARN | 57 |
| 3.13.1.1. Homogeneizado del tejido | 57 |
| 3.13.1.2. Extracción del ARN | 57 |
| 3.13.2. Síntesis del ADN complementario (ADNc) | 58 |
| 3.13.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real | 58 |
| 3.14. MICROARRAYS | 58 |
| 3.14.1. Extracción del ARN total de pulmón de ratón e hibridación en la plataforma de microarray | 59 |
| 3.14.2. Análisis bioinformático | 60 |
| 3.14.3. Procesamiento previo | 60 |
| 3.14.4. Expresión diferencial de genes | 61 |
| 3.14.5. Análisis funcional | 61 |
| 3.15. MEDIDA DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS | 61 |
| 3.15.1. Obtención de extractos proteicos | 61 |
| 3.15.1.1. Preparación del extracto de pulmón y cuantificación proteica | 61 |
| 3.15.1.2. Extracción de proteínas a partir de biopsias de esófago | 61 |
| 3.15.2. Inmunodetección de proteínas | 62 |
| 3.16. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO | 63 |
| 3.16.1. Inclusión de muestras | 63 |

| | |
|---|-----------|
| 3.16.2. Inmunohistoquímica | 64 |
| 3.16.3. Tinción hematoxilina/eosina | 64 |
| 3.16.4. Tinción tricrómica de Masson..... | 65 |
| 3.16.5. Tinción Alcian blue/PAS | 65 |
| 3.17. LOCALIZACIÓN Y DETECCIÓN DEL ARNsi TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL | 65 |
| 3.18. DETERMINACIÓN DE LA HIPERRRESPUESTA BRONQUIAL A METACOLINA | 66 |
| 3.19. EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LA INFLAMACIÓN PULMONAR POR TÉCNICAS DE IMAGEN..... | 66 |
| 3.19.1. Tomografía computarizada | 66 |
| 3.19.2. Tomografía molecular de fluorescencia | 67 |
| 3.20. ANÁLISIS CÉLULAR DE LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES..... | 68 |
| 3.20.1. Obtención de los lavados broncoalveolares | 68 |
| 3.20.2. Contaje de células totales | 68 |
| 3.20.3. Análisis del porcentaje de poblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo | 68 |
| 3.21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 69 |
| 4. RESULTADOS | 71 |
| 4.1. AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE SOCS3 EN UN MODELO ANIMAL DE ASMA CRÓNICA: MODULACIÓN POR GALECTINA-3..... | 73 |
| 4.1.1. Variación del perfil de expresión génica en ratones sensibilizados a OVA tratados con la terapia génica | 73 |
| 4.1.2. Comprobación de la reducción de la expresión de SOCS en los pulmones de los ratones..... | 75 |
| 4.2. ESTUDIO DEL PAPEL DE SOCS3 EN PACIENTES CON ENFERMEDADES DE TIPO Th2: IMPLICACIÓN DE LOS EOSINÓFILOS | 77 |
| 4.2.1. Expresión de SOCS3 en eosinófilos de pacientes con asma y BENA | 77 |
| 4.2.1.1. Características clínicas de los pacientes | 78 |
| 4.2.1.2. Expresión de SOCS3 en eosinófilos | 79 |
| 4.2.1.3. Identificación de SOCS3 en eosinófilos por inmunocitoquímica | 79 |
| 4.2.1.4. Correlación de los niveles en suero de IgE y la expresión de SOCS3..... | 80 |
| 4.2.2. Expresión de SOCS3 en la esofagitis eosinofílica | 80 |
| 4.2.2.1. Descripción de los individuos reclutados para el estudio | 80 |
| 4.2.2.2. Aumento de la expresión génica de SOCS1 y SOCS3 en biopsias de esófago proximal de pacientes con EoE..... | 82 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.2.3. El eje eotaxina-3/CCR3 y las citocinas Th2, IL-5 e IL-13, aumentan su expresión en pacientes con esofagitis eosinofílica | 83 |
| 4.2.2.4. Implicación de la vía Erk en la patología de la esofagitis eosinofílica | 84 |
| 4.2.2.5. Correlación de SOCS3 con los genes analizados | 85 |
| 4.2.2.6. La expresión de SOCS3 y el perfil de citocinas no se modifican en los pacientes con EoE en comparación con los sujetos control en células de sangre periférica y suero . | 86 |
| 4.2.2.7. Modificación de la expresión de SOCS3 en el esófago de pacientes con EoE sometidos a dieta de restricción | 87 |
| 4.2.3. Regulación de la expresión de SOCS3 por diversos factores | 88 |
| 4.2.3.1. Estimulación de la expresión génica de SOCS3 por citocinas Th2 pero no Th1 ... | 88 |
| 4.2.3.2. El tratamiento con PGE ₂ incrementa la expresión de SOCS3 en eosinófilos de controles sanos..... | 90 |
| 4.2.4. Análisis de la función de SOCS3 en eosinófilos de pacientes asmáticos: | |
| Silenciamiento génico de SOCS3 | 91 |
| 4.2.4.1. Descripción clínica de los pacientes asmáticos seleccionados para el estudio | 91 |
| 4.2.4.2. Silenciamiento génico de SOCS3 en eosinófilos purificados de sangre de pacientes asmáticos..... | 92 |
| 4.2.4.3. Análisis de los factores reguladores más importantes de la respuesta inmune en los eosinófilos tras el silenciamiento génico de SOCS3 | 94 |
| 4.2.4.4. Supresión de la migración de los eosinófilos tratados con el ARNsi de SOCS3.... | 95 |
| 4.2.4.5. Reducción de la adhesión en eosinófilos con expresión deficiente de SOCS3 | 97 |
| 4.2.4.6. Recuperación de la degranulación de los eosinófilos con expresión reducida en SOCS3 | 98 |
| 4.2.4.7. Evaluación de las vías de señalización JAK/STAT y Ras/ ERK | 99 |
| 4.3. TERAPIA INTRANASAL DE SILENCIAMIENTO GÉNICO DE SOCS3 EN UN | |
| MODELO ANIMAL DE ASMA CRÓNICA | 100 |
| 4.3.1. Localización pulmonar del ARNsi tras su instilación intranasal en ratones..... | 101 |
| 4.3.2. Inhibición de SOCS3 en los pulmones mediante la terapia de silenciamiento génico .. | 101 |
| 4.3.3. Efecto del silenciamiento génico de SOCS3 en la función pulmonar | 104 |
| 4.3.4. Análisis de la estructura pulmonar por tomografía computarizada | 105 |
| 4.3.5. Visualización de la inflamación pulmonar por tomografía molecular de fluorescencia . | 106 |
| 4.3.6. Reducción del infiltrado celular inflamatorio en los lavados broncoalveolares | 107 |
| 4.3.7. Examen histopatológico en los pulmones de los ratones | 109 |
| 4.3.7.1. Infiltrado inflamatorio | 109 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.7.2. Fibrosis pulmonar | 110 |
| 4.3.7.3. Producción de moco..... | 110 |
| 4.3.8. La respuesta humoral no se altera en los ratones con asma crónica tras recibir el tratamiento con ARNsi de SOCS3..... | 111 |
| 4.3.9. Efecto del silenciamiento de SOCS3 en el perfil de expresión de citocinas en el pulmón | 112 |
| 4.3.10. El tratamiento con ARNsi de SOCS3 inhibe la fosforilación de STAT3..... | 114 |
| 4.3.11. La activación de la vía RhoA/ Rho kinasa se modifica tras la terapia con ARNsi de SOCS3 | 115 |
| 4.3.12. Modificación del perfil de expresión de micro ARNs en pulmón tras el silenciamiento de SOCS3 | 116 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 119 |
| 5.1. SOCS3 COMO POSIBLE NUEVA DIANA EN EL TRATAMIENTO DEL ASMA Y OTRAS ENFERMEDADES Th2 | 122 |
| 5.2. EXPRESIÓN DE SOCS3 EN EOSINÓFILOS DE PACIENTES CON ENFERMEDADES DE TIPO Th2 | 124 |
| 5.2.1. Expresión de SOCS3 en eosinófilos humanos de sangre periférica | 124 |
| 5.2.2. SOCS3 en la esofagitis eosinofílica | 125 |
| 5.2.3. Regulación de SOCS3 en eosinófilos | 127 |
| 5.2.4. Evaluación de la función de SOCS3 en eosinófilos purificados de pacientes asmáticos mediante la técnica de silenciamiento génico | 129 |
| 5.2.4.1. La supresión de la expresión de SOCS3 modifica la respuesta inmune en los eosinófilos..... | 131 |
| 5.2.4.2. Relación entre la expresión de SOCS3 y la modulación de diversas funciones en el eosinófilo..... | 132 |
| 5.2.4.2.1. Migración | 132 |
| 5.2.4.2.2. Adhesión | 133 |
| 5.2.4.2.3. Degranulación | 134 |
| 5.3. TERAPIA DE SILENCIAMIENTO DE SOCS3 EN UN MODELO ANIMAL DE ASMA CRÓNICA | 136 |
| 5.3.1. Elección de un buen modelo de asma crónica y una terapia adecuada | 136 |
| 5.3.2. Especificidad de la terapia de silenciamiento de SOCS3 | 139 |
| 5.3.3. Eficacia del silenciamiento de SOCS3 en el modelo de asma crónica en la reversión de los procesos de hiperreactividad bronquial, inflamación y remodelado | 140 |

| | |
|-------------------------------|-----|
| 6. CONCLUSIONES..... | 149 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 152 |
| 8. ANEXO: PUBLICACIONES | 181 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| 15-HETE | Ácido 15-hidroxieicosatetraenoico |
| A | Absorbancia |
| AA | Ácido araquidónico |
| ADAM3 | Dominio de desintegrina y metaloproteinasa 3 |
| ADBR2 | Receptor beta 2 adrenérgico |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | ADN complementario |
| ADNdc | ADN doble cadena |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico |
| APC | Aloficocianina |
| ApoB | Apolipoproteína B |
| APRIL | Ligando inductor de proliferación |
| ARG | Arginasa |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNc | ARN complementario |
| ARNi | ARN de interferencia |
| ARNm | ARN mensajero |
| ARNmi | Micro ARN |
| ARNsi | Pequeño ARN de interferencia |
| ARNsh | ARN en forma de pequeña horquilla |
| BCL-2 | Linfoma de células B 2 |
| BENA | Bronquitis eosinofílica no-asmática |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CAP | Campo de alto poder |
| CASP3 | Gen de la caspasa 3 |
| CCL | Ligando de quimioquina (motivo CC) |
| CCR | Receptor de quimioquina (motivo CC) |
| C- | Control negativo |
| CDe | Células dendríticas |
| CD | Grupo de diferenciación |
| CIS | Proteína inducible de citocinas que contienen el dominio SH2 |
| CLC | Cristales de Charcot-Leyden |
| CNTF | Factor neurotrófico ciliar |
| COS1 | Células derivadas de la línea celular del mono verde africano (CV1) |
| CpG | Dinucleótidos de citosina-fosfato-guanina de ADN |
| TC | Tomografía computarizada |
| CT1 | Cardiotrofina 1 |
| CTLA-4 | Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico |
| CXCL | Ligando de quimioquina (motivo CXC) |
| CXCR | Receptor de quimioquina (motivo CXC) |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|--|
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenilindol |
| DE | Desviación estándar |
| DGCR8 | Región crítica 8 del síndrome de DiGeorge |
| Dicer | Endorribonucleasa Dicer |
| dNTP | Desoxirribonucleótido fosfato |
| D.O. | Densidad óptica |
| ECL | Potenciador de la quimioluminiscencia |
| ECP | Proteína catiónica del eosinófilo |
| EDN | Neurotoxina derivada del eosinófilo |
| EDTA | Ácido etilendiamino tetracético |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| ELISA | Enzimoinmunoensayo |
| EoE | Esofagitis eosinofílica |
| EPO | Peroxidasa del eosinófilo |
| ERK | Kinasa regulada por señales extracelulares |
| ESS | Dominio SH2 extendido |
| EREA | Enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina |
| Fab | Fracción variable |
| Fc | Fracción constante |
| FcαRI | Receptor Fc alpha I |
| FcϵRI | Receptor de alta afinidad para la IgE |
| FcϵRII | Receptor de baja afinidad para la IgE |
| FcγRI | Receptor Fc gamma I |
| FCER1G | Fragmento del receptor Fc épsilon de alta afinidad |
| FCG2B | Receptor de la región Fc de inmunoglobulinas gamma agregadas |
| FeNO | Fracción exhalada de óxido nítrico |
| FITC | Isocianato fluoresceína |
| FPR | Receptor del péptido formil |
| FOXF1A | Caja "forkhead" F1A |
| FOXP3 | Caja "forkhead" 3 |
| Gal-3 | Galectina-3 |
| GAP | Proteína activada por GTPasa |
| GATA | Proteína de unión a la secuencia GATA |
| G-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos |
| GH | Hormona de crecimiento |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos |
| GTP | Guanidín trifosfato |
| GTPasa | Guanosina trifosfatasa |
| GWAS | Estudio de asociación de genoma completo |
| HEPES | Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico |

| | |
|---------------------------------|--|
| HLA | Antígeno leucocitario humano |
| HMOX1 | Hemo-oxigenasa 1 |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| HRB | Hiperreactividad bronquial |
| HRP | Peroxidasa del rábano |
| HUVEC | Células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano |
| ICAM-1 | Molécula de adhesión intercelular 1 |
| IDO | Indolamina 2, 3-dioxigenasa |
| IFN | Interferón |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IgH | Inmunoglobulina pesada |
| IL | Interleucina |
| ILC | Nuocitos o células naturales cooperadoras |
| iNOS | Óxido nítrico sintasa inducible |
| INV | Inducción en número de veces |
| JAK | Kinasa Janus |
| kDa | Kilodalton |
| KEGG | Enciclopedia de Kioto de genes y genomas |
| KIR | Región inhibidora de kinasa |
| L | Ligando |
| LAG3 | Gen activador de linfocitos 3 |
| LBA | Lavado broncoalveolar |
| LFA-1 | Antígeno asociado a la función del linfocito |
| LIF | Factor inhibidor de leucemia |
| LPM | Proteína de membrana latente del virus Epstein-Barr |
| LTC4 | Leucotrieno C4 |
| LTD4 | Leucotrieno D4 |
| LTE4 | Leucotrieno E4 |
| M1 | Macrófagos clásicamente activados |
| M2 | Macrófagos activados alternativamente |
| MAPK | Proteínas kinasas activadas por mitógenos |
| MBP | Proteína mayor básica |
| MEC | Matriz extracelular |
| MIF | Factor inhibidor de la migración |
| MIP-1α | Proteína de inflamación de los macrófagos 1 α |
| miR | micro ARN |
| MHC I | Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I |
| MHC II | Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II |
| MMP | Metaloproteinasas |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|--|
| MS4A2 | Gen que codifica para la subunidad beta del receptor épsilon de inmunoglobulina de alta afinidad |
| NFG | Factor de crecimiento neuronal |
| NF-κB | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| NKT | Célula T de tipo “natural killer” |
| NOD | Proteína con dominio de oligomerización de unión a nucleótido |
| NOS | Óxido nítrico sintasa |
| NPSR1 | Receptor del neuropéptido S 1 |
| NS | No significativo |
| ORLMD | ORM-isoforma de la proteína de levadura |
| OSM | Oncostatina M |
| OVA | Ovoalbúmina de pollo |
| PAF | Factor activador de plaquetas |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PAR | Receptor activador de proteinasa |
| PAS | Ácido periódico de Schiff |
| PBMC | Células mononucleares de sangre periférica |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PC | Fosfatidilcolina |
| PC₂₀ | Concentración de metacolina/histamina que causa una caída del 20% respecto al VEF ₁ basal |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PDGF | Factor derivado del crecimiento de plaquetas |
| p.e. | por ejemplo |
| PE | Ficoeritrina |
| pEGFP | Plásmido codificante de la proteína verde fluorescente |
| pEGFP-Gal-3 | Plásmido codificante de la proteína verde fluorescente y del gen de la Galectina-3 |
| PEI | Polietilenimina |
| PEST | Motivo enriquecido en prolina, ácido glutámico, serina y treonina |
| PET | Tomografía por emisión de positrones |
| PGE₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PI3K | Fosfatidil-inositol kinasa 3 |
| PIRB | Receptor B de tipo inmunoglobulina pareado |
| PKN3 | Proteína kinasa N3 |
| PLGA | Ácido glicólico poli-láctico |
| PLK1 | Kinasa similar a polo 1 |
| PMFS | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| PPAR | Receptor activador de la proliferación de peroxisomas |

| | |
|--------------------------------|---|
| PRAM1 | Molécula adaptadora regulada por PML-RARA 1 |
| PRL | Prolactina |
| PRR | Receptor de reconocimiento de patrones |
| PSG | Ligando glicoproteico de la P-selectina |
| PTEN | Proteína homólogo de fosfatasa y tensina |
| R | Receptor |
| RAGE | Receptor de productos finales de glicación avanzados |
| RANTES | Quimioquina secretada y expresada por linfocitos T normales regulada por activación |
| RBD | Dominio de unión a ARN de doble cadena |
| RIG | Gen inducible por ácido retinoico |
| RIN | Número de integridad del ARN |
| RISC | Complejo de silenciamiento inducido por ARN |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| ROCK | Proteína kinasa asociada a Rho |
| RORα | Receptor alpha huérfano relacionado con el retinoide |
| ROS | Especie reactiva de oxígeno |
| RRM2 | Motivo de reconocimiento de ARN 2 |
| RUNX | Factor de transcripción relacionado con Runt |
| SCF | Factor celular “stem” |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SH2 | Dominio homólogo a las proteínas Scr 2 |
| SMAD3 | Homólogo decapentaplégico de tipo “mothers against” 3 |
| SOCS | Supresor de la señalización de citocinas |
| SS | Solución salina |
| STFi | Suero de ternera fetal inactivado |
| STAT | Factor transductor de la señal y activador de la transcripción |
| TCR | Receptor de las células T |
| TFM | Tomografía de fluorescencia molecular |
| TGF | Factor transformante de crecimiento |
| Th | T cooperadora |
| Tyr | Tirosina |
| TPO | Trombopoyetina |
| Treg | T reguladora |
| TLR | Receptor de tipo Toll |
| TMB | 3,3',5,5'-tetrametilbencidina |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral-alpha |
| TSH | Tirotropina |
| TSLP | Linfopoyetina del estroma tímico |
| U | Ubiquitina |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| UH | Unidades Hounsfield |
| VCAM-1 | Molécula de adhesión a células vasculares 1 |
| VEF ₁ | Volumen espiratorio forzado en el primer segundo |
| VEGF | Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| VIH | Virus de inmunodeficiencia adquirida |
| VLA-4 | Antígeno muy tardío-4 |
| VRS | Virus respiratorio sincitial |
| vs | versus |
| WNT5A | Miembro 5A de la familia con sitios de integración de tipo MMTV “sin alas” |
| ZFP36 | Proteína con motivos de dedos de zinc 36 |

INTRODUCCIÓN

1.1. LA RESPUESTA INMUNE DE TIPO 2

El sistema inmune es la defensa natural del cuerpo contra una gran diversidad de organismos patógenos; pero también es el causante de varias enfermedades, entre las que se encuentran las enfermedades autoinmunes y las alergias. En los mamíferos, la respuesta inmune se agrupa en muchas ocasiones dentro de dos grandes categorías: tipo 1 y tipo 2 [1]. Ambas respuestas integran elementos tanto del sistema inmune innato, que constituye la primera barrera defensiva frente a un agente extraño, como del sistema inmune adaptativo que actúa amplificando los mecanismos protectores de la inmunidad innata, gracias a la memoria generada tras el primer contacto con el antígeno. La naturaleza y la duración de la respuesta inmune adaptativa depende en gran medida de la discriminación inicial de señales de peligro frente a señales inocuas, así como de antígenos propios frente a extraños, llevada a cabo por las células de sistema inmune innato [2].

Las respuestas de tipo 1 son inducidas para erradicar la presencia de bacterias, virus, hongos y protozoos en el huésped y están mediadas principalmente por células T cooperadoras CD4⁺ (Th) pertenecientes a los subgrupos Th1 y Th17, células T citotóxicas CD8⁺ e inmunoglobulinas de isotipo G (IgG) [3]. Cuando las respuestas de tipo 1 se orquestan para actuar contra antígenos propios se desencadenan lo que se conoce como desórdenes autoinmunes [4].

Las respuestas de tipo 2 se activan para combatir infestaciones causadas por parásitos extracelulares, como los helmintos; pero también es el mecanismo inmune principal que interviene en enfermedades inflamatorias de tipo alérgico como el asma, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica o la esofagitis eosinofílica [5]. En esta respuesta participan fundamentalmente los linfocitos de los subtipos Th2 y Th9, los eosinófilos, los mastocitos, los basófilos y en este caso, la inmunoglobulina mayoritariamente secretada por parte de las células plasmáticas es la IgE [6].

1.1.1. INICIACIÓN Y PROPAGACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE TIPO 2

La primera fase de la respuesta inmune de tipo 2 se inicia con el contacto de alérgenos, microbios o agentes irritantes, con las mucosas de los tejidos (pulmón, piel, esófago, intestino, etc...) que van a dañar y/o activar a las células epiteliales (Figura 1). Éste es el principal estímulo para el reclutamiento de células dendríticas (CDe) inmaduras desde la médula ósea [7], que va a estar dirigido por una serie de quimioatrayentes liberados por el epitelio activado, como CCL20, CCL19 y CCL27 [8]. Una vez alcanzado el tejido diana, las CDe comienzan a captar antígenos mediante receptores del sistema inmune innato como el TLR4 (*toll like receptor 4*) y los receptores de lectina de tipo-C [9], y maduran hasta adquirir la capacidad de célula presentadora de antígeno (CPA), gracias a la presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), interleucina (IL)-4, factor de necrosis tumoral α (TNF α), linfopoyetina del estroma tímico (TSLP) [10, 11], IL-25 [12] e IL-33 [13]; todos ellos liberados por las células epiteliales y otras células estructurales e inmunes.

INTRODUCCIÓN

En el caso de la alergia, en esta primera fase denominada de **sensibilización**, el proceso de captación de alérgenos por parte de las células dendríticas es muy activo, ya que en los individuos alérgicos las CDe expresan el receptor de alta afinidad para la IgE, facilitando la interacción del alérgeno a través de su unión a IgE [14]. Los antígenos una vez captados por las CDe son procesados en pequeños péptidos y presentados en el contexto de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II) al receptor de las células T (TCR) presente en la superficie de dichas células, a la vez que se establecen una serie de señales co-estimuladoras necesarias para la activación completa del linfocito. El proceso de presentación antigénica tiene lugar en los nódulos linfáticos adyacentes al tejido diana. Además para que se complete la diferenciación hacia el fenotipo Th2, la sinapsis inmunológica debe realizarse en un entorno con altos niveles de IL-4 [15] y bajos niveles de IL-2 [2, 16]. La IL-4 es clave puesto que activa a los dos factores de transcripción esenciales en el establecimiento de este subtipo celular: STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*) y GATA-3 (*GATA-binding protein 3*) [17]. La fuente de IL-4 ha sido investigada y discutida en varios trabajos, se ha descrito la producción de esta interleucina en células T CD4+ sin polarizar o naïve, en mastocitos y en basófilos. Estos últimos también han sido postulados como posibles células presentadoras de antígeno, aunque recientemente se ha publicado que la función de los basófilos consiste principalmente en amplificar la inmunidad Th2 iniciada por las células dendríticas [8, 18]. Tras la polarización hacia un fenotipo Th2 dependiente de antígeno, los linfocitos adquieren su capacidad efectora, secretando interleucinas de tipo 2 como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 que van a reclutar nuevos linfocitos Th2, eosinófilos, mastocitos y macrófagos al foco inflamatorio; además interaccionan con los linfocitos B que se diferencian a su vez en células plasmáticas productoras de anticuerpos, que gracias a la presencia de IL-4, estimulan el cambio de isotipo de inmunoglobulina G a IgE.

Recientemente se ha descrito un nuevo tipo celular implicado en la respuesta inmune de tipo 2: los nuocitos, también conocidos como células naturales de tipo 2 cooperadoras (ILC2) [19] (Figura 1). El factor de transcripción máster expresado en estas células es ROR α (*retinoid-related orphan receptor α*) [20]. Los nuocitos residen en las mucosas y responden a señales de peligro que alteran la integridad de las células epiteliales, liberando grandes cantidades de citocinas de tipo 2, principalmente IL-13 e IL-5 [21].

En una segunda fase se produce la reentrada del antígeno en el organismo y el contacto con el tejido diana “activado” durante la anterior fase. En las respuestas alérgicas en particular, la **segunda fase** de la respuesta inmune tipo 2 comprende dos etapas: **fase inmediata** y **fase tardía**.

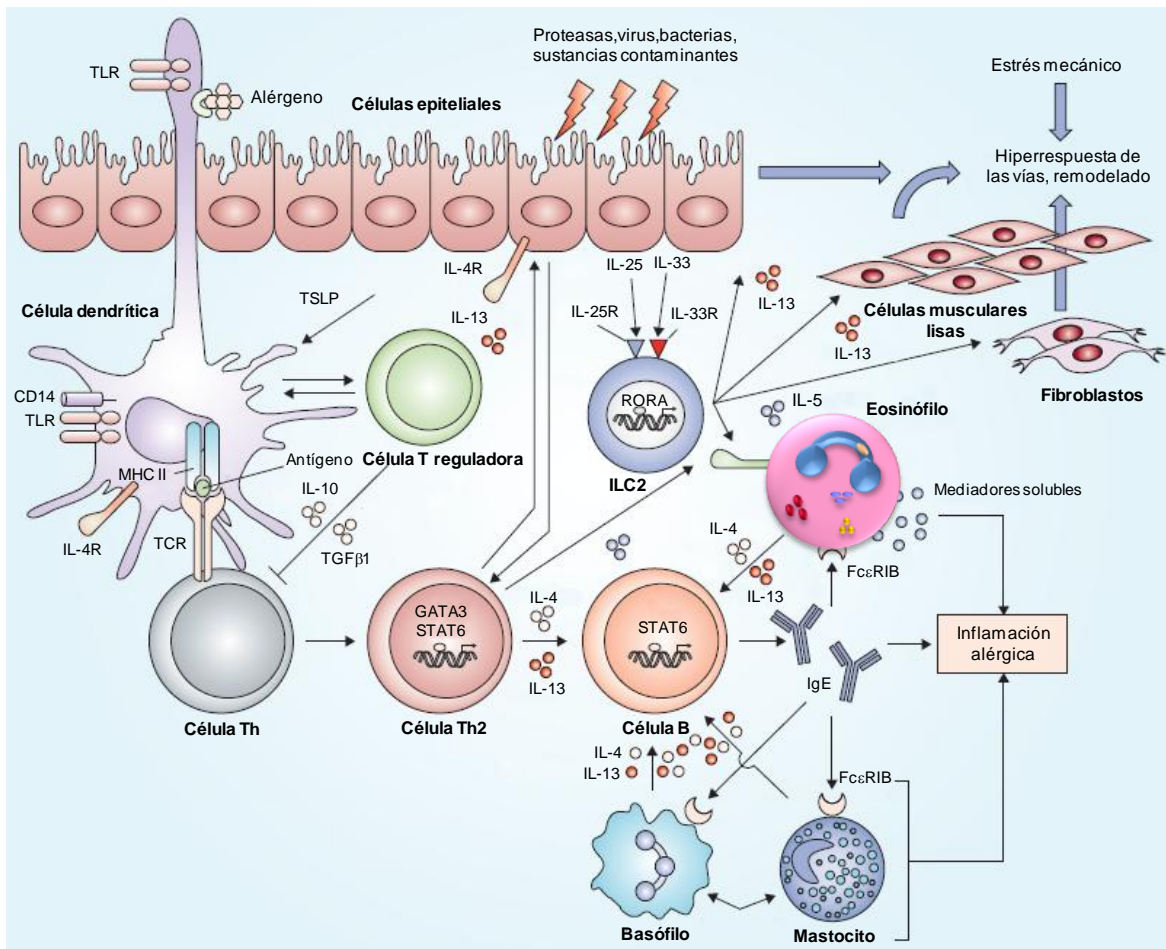


Figura 1. Principales vías implicadas en la generación de la respuesta inmune alérgica de tipo 2. En el esquema se muestran los componentes innatos y adaptativos que participan en la inflamación alérgica, incluyendo las células ILC2 que también liberan citocinas Th2 en respuesta al daño epitelial. También se representan las conexiones existentes entre los cambios estructurales en el pulmón y las respuestas inmunes que los originan. IL, interleucina; TLR, receptor de tipo Toll; TSLP, linfopoyetina del estroma tímico; TGF, factor transformante; TCR, receptor de la célula T; Th, célula T cooperadora; Th2, célula T cooperadora de tipo 2. (Figura modificada de Martínez FD. 2013 Lancet. 382:1360-72).

En la reacción inmediata, el alérgeno se une a las regiones Fab de la IgE secretada formando inmunocomplejos que se unen a los receptores Fcε de alta afinidad (FcεRI), presentes en la superficie de basófilos y mastocitos, lo que provoca su activación mediante el entrecruzamiento de los receptores. La secreción de IgE por parte de las células B es uno de los mecanismos efectores más importantes en la inmunidad de tipo 2, y el reconocimiento de los alérgenos por parte de la IgE presente en los mastocitos y basófilos es el responsable de la inducción de los principales mecanismos que tienen lugar en las respuestas alérgicas clásicas a través de la degranulación y consecuente liberación de numerosos mediadores de la inflamación entre los que se destacan la histamina y los leucotrienos; responsables de los síntomas típicos de la fase inmediata de la reacción alérgica en forma de broncoespasmo, rinitis, urticaria, diarrea, vómitos y/o anafilaxia.

INTRODUCCIÓN

La **fase tardía** comienza aproximadamente entre 4 y 6 horas después de producirse la fase inmediata y en ella recae la responsabilidad de la propagación y el mantenimiento de la repuesta inmune adaptativa Th2. La presencia de IL-5 e IL-9, producida por células Th2 infiltradas en los tejidos afectados, desencadena el reclutamiento de eosinófilos y mastocitos respectivamente, que contribuyen al proceso inflamatorio. Las células Th2 también son capaces de actuar directamente en las células epiteliales y musculares a través de la liberación de IL-4, IL-9 e IL-13, para inducir la producción de moco, la metaplasia de las células caliciformes y el aumento de la reactividad de las vías respiratorias. Además, estos nuevos contactos con el alérgeno reactivan poblaciones de memoria de linfocitos T y B, que permanecían como remanentes tras la fase inicial de sensibilización manteniendo activa la repuesta inmune.

La resolución de la respuesta inmune de tipo 2 está controlada de forma natural por un subtipo de células T, conocido como células T reguladoras (Treg) (Figura 1). Por ejemplo, en la enfermedad asmática, el papel protector que ejercen estas células está sustentado en los datos epidemiológicos de varios estudios del perfil inmunológico realizado en familias de granjeros [22, 23]. En estas poblaciones, la exposición al ambiente típico de una granja se asocia a un mayor número de células Treg en sangre de cordón umbilical y menores niveles de secreción de citocinas Th2.

De todas las células integrantes de la respuesta inmune de tipo 2, los eosinófilos son decisivos en la propagación y el mantenimiento del estado inflamatorio, pero su carácter pleiotrópico los sitúa en muchos otros escenarios siempre relacionados con este tipo de respuesta, lo que sugiere una gran importancia de estas células en la coordinación de la inmunidad de tipo 2.

1.2. EL EOSINÓFILO: CÉLULA CARACTERÍSTICA DE LA RESPUESTA DE TIPO 2

Los eosinófilos son leucocitos polimorfonucleares con un núcleo bilobulado muy característico, descritos por primera vez por Paul Ehrlich en 1879, gracias a la capacidad de sus gránulos de captar colorantes ácidos como la eosina [24]. Son células multifuncionales involucradas en el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos, la modulación de las respuestas inmunes adaptativas, y la inmunidad innata frente a ciertos patógenos [25, 26]. También son capaces de producir una serie de citocinas inmunorreguladoras que desempeñan funciones de forma activa en la regulación de las respuestas inmunes de tipo 2. En conjunto, estas características confieren una gran plasticidad funcional a los eosinófilos que pueden participar en condiciones tan dispares como la resolución de una infestación por parásitos, generando presumiblemente un beneficio para el individuo afectado, o en las enfermedades alérgicas mediadas por hipersensibilidad, en las que el eosinófilo actúa generalmente en detrimento del paciente.

Las múltiples funciones que los eosinófilos son capaces de acometer a través de la expresión y/o liberación de moléculas de diferente naturaleza se desglosan a continuación.

1.2.1. FUNCIONES EFECTORAS DE LOS EOSINÓFILOS

1.2.1.1. Liberación de las proteínas de los gránulos

Una de las funciones efectoras más agresivas del eosinófilo se realiza a través de la liberación del contenido de los granulos (mediadores tóxicos de naturaleza básica) mediante exocitosis o degranulación [27] (Figura 2). Estos gránulos presentan un cuerpo central compuesto por la proteína mayor básica (MBP), y una matriz constituida por la proteína catiónica del eosinófilo (ECP), la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) y la peroxidasa del eosinófilo (EPO). La MPB, EPO y ECP son tóxicas para una gran variedad de tejidos como el corazón, el cerebro, y el epitelio bronquial [28]; además la ECP y EDN son enzimas con actividad ribonucleasa reconocidas por su capacidad antiviral [29].

1.2.1.2. Expresión de receptores Fc

Los eosinófilos expresan una serie de receptores Fc con capacidad de unir inmunoglobulinas (Ig) que van a desencadenar una serie de procesos efectores. Por ejemplo, la expresión de Fc α R en eosinófilos de pacientes con infestaciones por parásitos permite la unión de IgA e IgG que activa la degranulación de la célula [30].

El papel de la IgE en la activación de los eosinófilos es extremadamente controvertido. Los eosinófilos expresan los dos receptores de unión a IgE (Fc ϵ R): el receptor de IgE de baja afinidad (Fc ϵ RII) y el receptor de IgE de alta afinidad (Fc ϵ RI). La presencia de este último se ha descrito en eosinófilos de pacientes con eosinofilia, así como su participación en funciones clave como la degranulación y la citotoxicidad frente a parásitos [31]. En cambio, otros estudios afirman que la expresión de receptores Fc ϵ RI en la superficie de eosinófilos de pacientes con enfermedades alérgicas o con eosinofilia es mínima, y que la activación por la unión del ligando de este receptor no es capaz de desencadenar degranulación [32, 33].

1.2.1.3. Secreción de mediadores lipídicos y otras moléculas inflamatorias

El metabolismo de los lípidos produce una serie de mediadores, que en general poseen un elevado potencial inflamatorio. Los eosinófilos contienen cuerpos lipídicos en los que se sintetizan leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas (Figura 2). La enzima fosfolipasa A2 hidroliza fosfolípidos de membrana para generar ácido araquidónico (AA), lisofosfatidilcolina y/o lisofosfatidiletanolamina. A partir del AA se obtendrán prostaglandinas y leucotrienos, así como lipoxinas y ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE). Por otro lado, la lisofosfatidiletanolamina es acetilada para formar el factor activador de plaquetas (PAF), que se acumula en los eosinófilos en grandes cantidades, y su secreción conduce a la activación de plaquetas y neutrófilos, además de inducir broncoconstricción [34]. Otros metabolitos de origen lipídico que abundan en los eosinófilos son los leucotrienos LTC₄, LTD₄ y LTE₄, capaces de inducir la contracción de la musculatura lisa, promover la secreción de moco y alterar la permeabilidad vascular [35].

INTRODUCCIÓN

Aparte de los mediadores lipídicos, los eosinófilos también contienen una gran diversidad de enzimas pro-inflamatorias entre las que se encuentran la arilsulfatasa B, localizada en pequeños gránulos en el interior del eosinófilo, la β -glucuronidasa, la metaloproteinasa-9, implicada en la migración de los eosinófilos, las histaminasas y las colagenasas [36, 37].

1.2.2. FUNCIONES INMUNORREGULADORAS

Los eosinófilos han sido considerados tradicionalmente como células potencialmente efectoras, sin embargo existen numerosas evidencias que apuntan hacia un papel inmunorregulador de estas células a través de acciones como la presentación antigénica y la liberación de citocinas y moléculas con capacidad inmunorreguladora.

1.2.2.1. Presentación antigénica

Los eosinófilos tienen la capacidad de internalizar, procesar y presentar péptidos antigénicos microbianos, virales y parasitarios, a través del MHC II; además expresan moléculas en su superficie que co-estimulan a los linfocitos T como CD80, CD86 y CD40 e interaccionan físicamente con las células T CD4⁺ [38]. Se han llevado a cabo numerosos estudios que confirman la capacidad presentadora de antígeno de los eosinófilos, promoviendo la expansión de células Th2 tanto *in vitro*, [39, 40] como en modelos animales *in vivo*. Estos eosinófilos se van a localizar en los nódulos linfáticos para acometer la interacción con los linfocitos T CD4⁺ *naïve* [41, 42]. En humanos, los eosinófilos inducen la expresión de MHC II, en este caso denominado HLA (*human leukocyte antigen*)-DR [43], y de las moléculas co-estimuladoras necesarias, como CD40 y CD86, para la activación de los linfocitos T [44, 45]. Además, el descubrimiento reciente de la expresión constitutiva en eosinófilos humanos del ligando de Notch: Jagged1, sugiere que estas células son capaces de establecer la señal de polarización adecuada a los linfocitos T CD4⁺ *naïve* [46, 47].

1.2.2.2. Producción de citocinas y otras moléculas inmunomoduladoras

Los eosinófilos secretan citocinas y quimioquinas tanto reguladoras como pro-inflamatorias. La regulación de las citocinas producidas puede actuar a diferentes niveles, por ejemplo, la IL-3 y el GM-CSF ejercen una modulación directa sobre el propio eosinófilo, conocida como regulación autocrina [48]. Salvando dichas excepciones, las citocinas, así como los factores derivados de los eosinófilos, se pueden dividir en dos grandes grupos en función de si afectan a células que componen tejidos o influyen a otras células inmunes.

Los eosinófilos modulan la integridad de los tejidos a través de múltiples factores que desencadenan procesos de remodelado y cambios en las propiedades fisiológicas. Cuando los eosinófilos se infiltran en los tejidos, expresan el factor transformante de crecimiento α (TGF α) y el TGF β 1 los cuales contribuyen al engrosamiento de las membranas basales [49, 50].

En particular, el TGF β favorece la síntesis y la proliferación de colágeno en los fibroblastos de la dermis y los pulmones [51], mientras que el TGF α aumenta la producción de moco por parte de las células del epitelio de las vías respiratorias [52]. La osteopontina, el factor celular de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de los nervios (NGF) y las metaloproteinasas (MMPs) son otros factores profibróticos y angiogénicos producidos por los eosinófilos humanos [37, 53-55].

Por otro lado, la producción de citocinas y quimioquinas por parte de los eosinófilos regula la función de otras células del sistema inmune. En este sentido, se ha descrito la expresión de una gran variedad de citocinas en eosinófilos humanos entre las que se incluyen IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 [56]. De todas ellas, cabe destacar la producción de IL-4 por los eosinófilos localizados en las vías respiratorias y la piel, que es fundamental para el establecimiento y la expansión de la respuesta Th2 en individuos con enfermedades alérgicas [57]. A esta pléyade de citocinas debe añadirse la producción del factor pro-inflamatorio TNF y las quimioquinas MIP-1 α (CCL3) y RANTES (CCL5), CCL7, CCL8, CCL11, CCL1, CXCL10 y CXCL12 [36, 58, 59].

Los eosinófilos son capaces de cambiar su morfología y fenotipo debido a la exposición de todos estos factores. Por ejemplo, los eosinófilos de sangre periférica de pacientes con infestaciones helmínticas, así como los eosinófilos obtenidos en lavados broncoalveolares de pacientes asmáticos, presentan una elevada expresión de una serie de moléculas implicadas en procesos de adhesión y de activación, entre las que se encuentran ICAM-1, HLA-DR, CD11b, CD11c, CD44, CD66, CD69 y CD81 [60, 61].

Los factores que activan a los eosinófilos han sido ampliamente estudiados, en cambio, existe muy poca información acerca de las citocinas y las moléculas que los inhiben. Uno de ellos es el TGF β , que gracias a su pleiotropía, puede actuar como citocina anti-inflamatoria disminuyendo los niveles de eosinófilos en cultivos de médula ósea humana [62]. Por otro lado, el IFN α y el IFN γ suprimen la eosinofilia inducida por antígeno y el reclutamiento de células T CD4 $^{+}$ en las vías aéreas de los ratones [63]; de hecho, el IFN α ha llegado a ser un tratamiento efectivo en ciertos pacientes con síndromes eosinofílicos [64]. La última molécula en unirse a la lista ha sido Siglec-8 (*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 8*), capaz de inducir apoptosis en los eosinófilos [65].

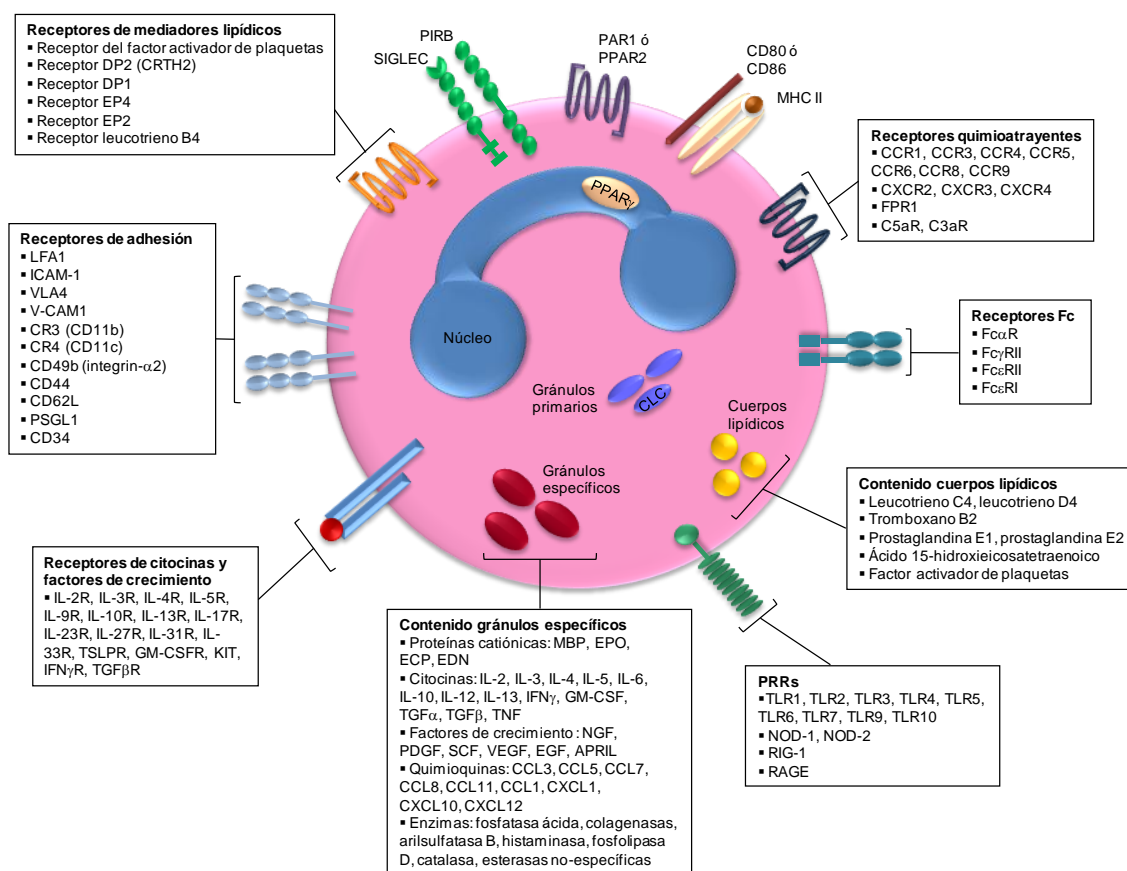


Figura 2. Características moleculares del eosinófilo. Los eosinófilos interactúan con el entorno a través de múltiples mecanismos y pueden liberar el contenido de sus gránulos específicos en respuesta a estímulos externos. Además, los eosinófilos sintetizan mediadores lipídicos y liberarlos en cuerpos lipídicos o acumular proteína en forma de cristales de Charcot-Leyden (CLC) en los gránulos primarios. Expresan una gran variedad de receptores que modulan los procesos de adhesión, crecimiento, supervivencia, activación, migración y reconocimiento de patrones. APRIL, el ligando inductor de proliferación; CCL, receptores de quimioquinas CC; CXCL, ligandos de quimioquinas CXC; CXCR, receptores de quimioquinas CXC; EGF, factor de crecimiento epidérmico; EPO, peroxidasa del eosinófilo; FPR1, receptor del péptido formil 1; GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos; IFN, interferon; IL, interleucina; MBP, proteína mayor básica; NGF, factor de crecimiento neuronal; NOD, proteína con dominio de oligomerización de unión a nucleótido; PAR, receptor activador de proteinasa; PDGF, factor derivado de crecimiento de plaquetas; PIRB, receptor B de tipo inmunoglobulina pareado; PPAR, receptor activador de la proliferación de peroxisomas; PRR, receptor de reconocimiento de patrones; PSG1, ligando glicoproteico de la P-selectina; RAGE, receptor para productos finales de glicación avanzados; RIG-I, gen I inducible por ácido retinoico; TGF, factor de crecimiento transformante; TLR, receptor de tipo Toll; TNF, factor de necrosis tumoral; SCF, factor de célula "stem"; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular.

1.2.3. CICLO VITAL DEL EOSINÓFILO

La eosinofilopoyésis es el proceso por el cual los eosinófilos se generan en la médula ósea a partir de progenitores pluripotenciales, definidos como células $CD34^+CD38^+IL-3R\alpha^+CD45RA^{IL-5R\alpha^+}$. La diferenciación comienza cuando se activan, entre otros, los factores de transcripción GATA-1, PU.1 y C/EBP [66].

La proliferación, la diferenciación, el tráfico y la supervivencia de los eosinófilos se encuentran regulados principalmente por las citocinas IL-5 e IL-3 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) [67, 68]. Estos tres factores hematopoyéticos están codificados por genes que se localizan en el cromosoma 5q31 y se unen a receptores que están formados por una cadena beta variable y una cadena alfa común. De todos ellos, la IL-5 es la citocina que más potente y específicamente estimula la diferenciación selectiva de los eosinófilos y su liberación desde la médula ósea a la circulación periférica [69].

Una vez en el torrente sanguíneo, el reclutamiento de los eosinófilos en las regiones inflamatorias, comienza con la adhesión al endotelio vascular, proceso que está mediado por las selectinas. Durante el rodamiento y anclaje inicial se produce la activación de los receptores de las integrinas de los eosinófilos, aumentando así la afinidad por sus ligandos y produciéndose una adhesión al endotelio mucho más firme.

Los eosinófilos adheridos firmemente al endotelio vascular, comienzan la migración dirigida al foco inflamatorio. Van a seguir un gradiente quimiotáctico enriquecido por la presencia de multitud de factores, entre los que se encuentran las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, secretadas fundamentalmente por los linfocitos Th2 y las células endoteliales, quimioquinas como RANTES y las eotaxinas 1, 2 y 3, que se unen selectivamente al receptor CCR3, situado en la superficie de los eosinófilos. En el tejido, los eosinófilos son capaces de sobrevivir casi dos semanas gracias a la regulación de la vía autocrina mediada por IL-5 y su receptor, esta permanencia tisular dependerá de las señales pro y anti-apoptóticas presentes en el ambiente (Figura 3).

En condiciones normales, en la circulación sanguínea los eosinófilos permanecen durante un corto periodo de tiempo (aproximadamente 18 h). La mayoría de los eosinófilos se dirigen al tracto gastrointestinal para mantener la integridad de la barrera epitelial y actuar de defensa frente a infecciones, residiendo en la lámina propia de todas las regiones, excepto en el esófago [70]. Otros destinos de los eosinófilos en condiciones homeostáticas son el timo, las glándulas mamarias y el útero. La presencia de eosinófilos en el útero favorece la preparación del mismo para la implantación del blastocisto [71]; mientras que en las glándulas mamarias ayudan a su desarrollo postnatal [72]. En todos los casos, el reclutamiento está regulado fundamentalmente por la eotaxina-1.

INTRODUCCIÓN

Los eosinófilos desempeñan un papel fundamental en la homeostasis del sistema inmune. En el timo, expresan principalmente MHC I, moléculas coestimuladoras, así como CD11c y CD25 entre otras, sugiriendo un fenotipo activado que participa en la eliminación de timocitos restringidos por la expresión de MHC I [73]. Por otro lado, los eosinófilos secretan un ligando que induce proliferación (APRIL), e IL-6 que favorecen la supervivencia de las células plasmáticas en la médula ósea [74].

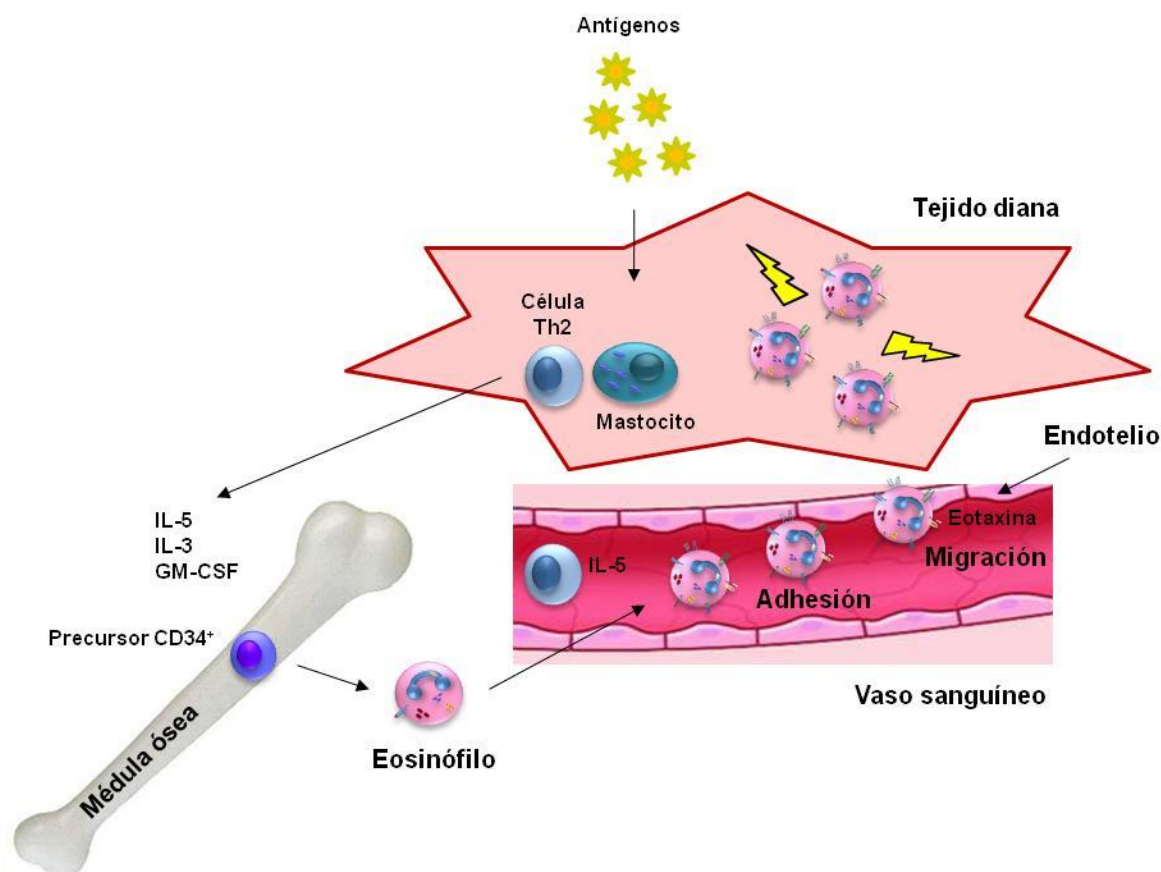


Figura 3. Ciclo vital del eosinófilo. Los mastocitos y linfocitos Th2 tras ser activados por células presentadoras de antígeno producen IL-5, IL-3 y GM-CSF que llegan hasta la médula ósea, promoviendo la diferenciación y maduración de los precursores CD34⁺ a eosinófilos que se dirigen al torrente sanguíneo, dónde mediante procesos de adhesión mediados por integrinas y posterior extravasación, migrarán al foco inflamatorio dirigidos fundamentalmente por la IL-5 y las eotaxinas producidas por las células Th2.

En respuesta a estímulos inflamatorios, se promueve la producción de eosinófilos en la médula ósea provocando un aumento del número de eosinófilos, tanto en la circulación sanguínea como en los tejidos diana, lo que se conoce como eosinofilia. Los principales factores asociados a este incremento de eosinófilos son la IL-5 y las eotaxinas. Recientemente, la linfopoyetina derivada del estroma tímico (TSLP), la IL-25 y la IL-33, también se han asociado a este proceso [75-77].

1.3. ENFERMEDADES EOSINOFÍLICAS CON FENOTIPO Th2

En la presente tesis se abordará el estudio de tres enfermedades: asma, bronquitis eosinofílica y esofagitis eosinofílica, porque todas ellas se caracterizan por presentar un perfil de producción de factores típicos de una respuesta inmune de tipo 2 (Th2), y en las que los eosinófilos son células clave tanto en el inicio como en la progresión de las mismas.

1.3.1 ASMA

El asma es una enfermedad que actualmente se estima afecta a más de 300 millones de personas en el mundo, con cerca de 250.000 muertes anuales [78]. Su prevalencia aumenta cada año, principalmente en los países occidentales, donde constituye la enfermedad crónica más común de la infancia [79]. La descripción operacional más aceptada en el ámbito clínico que abarca características clínicas, fisiológicas (Figura 4) y patológicas, establece lo siguiente:

El asma es un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias en el cual participan diversas células y elementos celulares. La inflamación crónica, constituida por un infiltrado celular principalmente de eosinófilos y linfocitos T, está asociada a un aumento en la hiperreactividad de las vías respiratorias que conduce a episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica, y tos, especialmente durante la noche o en el inicio del día. Estos episodios se asocian generalmente con la obstrucción variable al flujo aéreo pulmonar, frecuentemente reversible espontáneamente o con tratamientos.

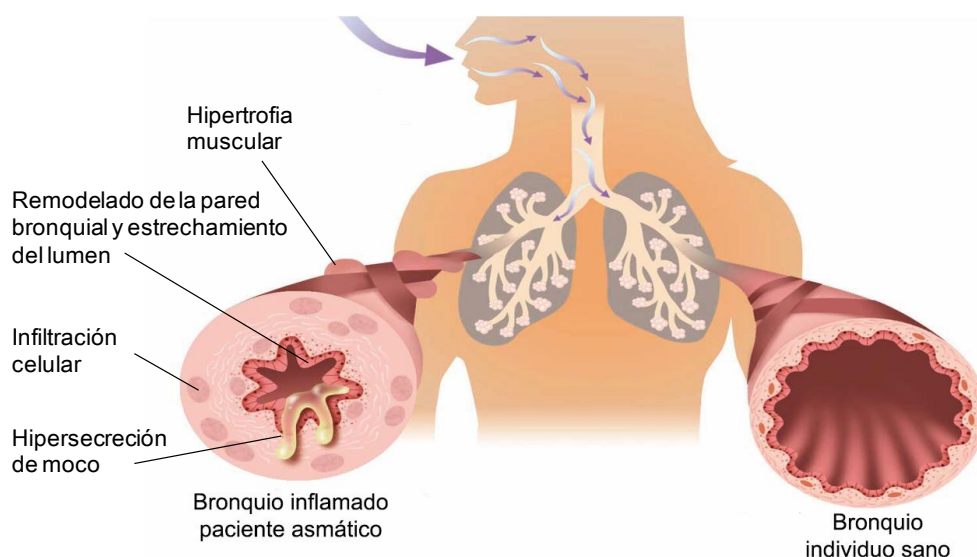


Figura 4. Alteraciones fisiológicas características de la patología asmática. Representación de un bronquio en un individuo sano (*derecha*) y en un paciente con asma (*izquierda*), donde se observa hipertrofia de la musculatura lisa bronquial, acúmulos de infiltrados inflamatorios, engrosamiento de la mucosa e hipersecreción de moco, y el remodelado de la pared bronquial que conlleva al estrechamiento del lumen. (Modificado de la imagen publicada por la Academia Americana de Alergia Asma e Inmunología, AAAAI, 2002).

INTRODUCCIÓN

Esta definición fue formulada por un comité de expertos reunidos por primera vez en el año 1995 (*NHLB/WHO Workshop*) dentro del programa GINA (*Global Initiative for Asthma*), y ha sido revisada sucesivamente en los años 2002, 2006 y 2012 [80].

A pesar del consenso establecido por el grupo de expertos, la definición de asma es vaga y general, de hecho, la prestigiosa revista científica *The Lancet* ha sugerido que el término asma es arcaico y que deberían establecerse nuevas definiciones centradas en aspectos clínicos y biológicos que englobasen su extremada complejidad y diversidad de fenotipos existentes [81].

1.3.1.1. Factores que influyen en la aparición y el desarrollo de la enfermedad asmática

Los factores que influyen en la enfermedad asmática pueden dividirse por un lado en aquéllos que causan la patogénesis y por otro, en aquéllos que participan en la aparición de los síntomas, si bien es cierto que muchos de ellos están implicados en ambos procesos. En general los factores intrínsecos al individuo (principalmente genéticos) tienen que ver con el desarrollo de la enfermedad, mientras que los factores ambientales intervienen más frecuentemente en la sintomatología asociada (Tabla 1) [82].

INTRÍNSECOS AL INDIVIDUOS

Généticos, p.e. :

- Genes que predisponen a la atopia
- Genes que predisponen a la hiperrespuesta de las vías

Obesidad

Sexo

AMBIENTALES

Alérgenos

Infecciones

Humo del tabaco

Polución

Dieta

Tabla 1. Factores influyentes en el desarrollo y la expresión del asma.

Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales actúan son complejos e interactivos. Por ejemplo, la susceptibilidad a padecer asma [83, 84] está determinada por la interacción de los genes entre sí y a su vez con diversos factores ambientales, y podrá ser modificada por otros aspectos como la maduración de la respuesta inmune y/o el número de infecciones padecidas durante los primeros años de vida. La sensibilización a múltiples aeroalérgenos en edades muy tempranas se ha relacionado con un importante aumento del riesgo a desarrollar asma [85].

Dicha predisposición, tanto a sufrir infecciones virales recurrentes en el pulmón, como a la sensibilización posterior a alérgenos, parece estar relacionada con un defecto en la producción de interferones β y λ , por parte de las células epiteliales [86].

En este contexto tan interactivo, la epigenética, que estudia cambios hereditarios que afectan a la expresión génica pero no conllevan un cambio en la secuencia del ADN, es uno de los campos de investigación más activos. De hecho, los mecanismos epigenéticos son esenciales para generar plasticidad en las respuestas debido a las exposiciones ambientales y contribuir en la variabilidad fenotípica.

En la actualidad se buscan “marcas” epigenéticas en el genoma humano, como la metilación del ADN o las modificaciones post-transcripcionales que sufren las histonas, las cuales puedan explicar en parte la gran diversidad de fenotipos existentes en el asma. En el caso de la metilación del ADN, algunos de los genes en los que se han encontrado cambios en el estado de metilación son: *ORMDL1-3*, *FOXP3*, *IL-13*, *RUNX3*, *NPSR1*, *IL-6*, *iNOS*, *ADRB2*, *NOS*, *ARG 1-2*, *CD14*, *STAT6*, *MS4A2* e *IL-4* [87].

Por último, existen otras características como las diferencias raciales y étnicas que también influyen en la prevalencia del asma, sustentadas en factores genéticos, ambientales y socioeconómicos [80].

1.3.1.2. Clasificación de los fenotipos asmáticos

La heterogeneidad que rodea a la enfermedad asmática ha conducido a dividir esta patología en diferentes fenotipos en los cuales se agrupan los individuos en función de los siguientes parámetros: la historia natural, las características clínicas y fisiopatológicas, así como los marcadores asociados, y por último, la respuesta a la terapia. En la tabla 2, se recogen los fenotipos asmáticos establecidos hasta el momento, que a continuación se describen con detalle.

| | Historia natural | Características clínicas | Fisiopatología y biomarcadores | Respuesta a la terapia |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--|---|
| Fenotipo “altamente” Th2 | | | | |
| Alérgico de inicio temprano | Inicio temprano, de moderado a grave | Síntomas alérgicos | Engrosamiento subepitelial de la membrana basal, IgE específica, citocinas Th2 | Responde a corticosteroides y tratamientos dirigidos contra la respuesta Th2 |
| Eosinofílico de inicio tardío | En adultos, frecuentemente grave | Sinusitis, menos alérgico | Resistente a corticosteroides, eosinofilia, IL-5 | Responde al anticuerpo anti-IL-5 y modificadores de los cisteinil leucotrienos, resistente a corticosteroides |
| Fenotipo “mínimamente” Th2 | | | | |
| Relacionado con la obesidad | Inicio en adolescentes y adultos | Principalmente mujeres afectadas, muy sintomático, poca hiperrespuesta bronquial | Falta de biomarcadores Th2, estrés oxidativo | Responde a la pérdida de peso, antioxidantes y terapia hormonal |
| Neutrofílico | Inicio en adultos | Bajo VEF ₁ , aumento del atrapamiento del aire | Neutrofilia en esputo, activación de vías Th17, IL-8 | Posible respuesta a antibióticos de la familia de los macrólidos |

Tabla 2. Fenotipos asmáticos definidos por características moleculares y clínicas. VEF₁, volumen espiratorio forzado en el primer segundo.

1.3.1.2.1. Fenotipos asmáticos Th2

A) Asma alérgica de tipo Th2 e inicio temprano

Este fenotipo es el más común en el que se incluyen casi la mitad de los pacientes diagnosticados con asma, y su pronóstico inicial puede ser tanto leve como grave. Estos pacientes se caracterizan por tener elevados niveles de citocinas de tipo Th2 y un infiltrado inflamatorio constituido principalmente por eosinófilos y mastocitos, que expresan gran cantidad de receptores para la IgE en su superficie [88, 89]. En el asma alérgica, la atopia (predisposición a desarrollar una respuesta mediada por IgE) es considerada un factor de riesgo, de hecho su aparición se asocia con otras enfermedades atópicas como la rinitis alérgica y la dermatitis atópica [90]; en cambio existen estudios de asociación del genoma completo (*genome-wide association study*, GWAS) que apuntan a la carga genética asociada con una historia familiar consistente, como el factor principal para desarrollar asma alérgica en detrimento de los niveles de IgE y la atopia [91, 92]. Los estudios de GWAS han revelado que los genes que están más implicados en la aparición de este fenotipo, son aquellos que se relacionan con la disfunción/activación del epitelio, más que con la alergia, como la IL-33 y su receptor; si bien es cierto que existen otros trabajos que reivindican la importancia de los genes Th2 en los fenotipos más graves de asma alérgica, en los cuales están altamente mutados [93]

- *Patogénesis del asma alérgica*

El fenotipo asmático de inicio temprano se manifiesta por la activación de la respuesta inmune de tipo 2 (Figura 1) desencadenada por la sensibilización a los alérgenos (proteínas inocuas para la gran mayoría de la población) inhalados. En el inicio y desarrollo de la patogénesis del asma alérgica van a participar en sinergia el componente alérgico y la unidad funcional que comprende la barrera epitelial. En los pacientes asmáticos, el epitelio es defectuoso, las uniones estrechas no están bien formadas y de este modo se facilita la entrada de alérgenos al tejido, muchos de ellos con capacidad proteolítica [94, 95], que atraviesan la barrera epitelial dañada y activan células con capacidad de unir inmunoglobulina E (IgE) a su membrana, como los mastocitos que presentan receptores específicos (Figura 1) provocando la liberación de mediadores pro-inflamatorios como la histamina, las especies reactivas de oxígeno (ROS), etc... Estos factores generan la contracción del músculo liso de las vías respiratorias, la secreción de moco, el aumento de la permeabilidad vascular y la extravasación de plasma, causando la obstrucción de las vías respiratorias y, por tanto, disminuyendo el flujo aéreo. En la sensibilización de las vías respiratorias también incurren agentes infecciosos y sustancias contaminantes que inciden sobre epitelio fomentando la pérdida de su integridad.

En una fase posterior (4-6 horas tras la exposición alérgica), las células dendríticas (CDe), que son células presentadoras de antígeno asociadas al epitelio de las vías respiratorias, inician la respuesta inmune adaptativa gracias a su capacidad presentadora de antígeno. Estas células, a través de receptores, van a captar antígenos, procesarlos en pequeños péptidos, y presentarlos a través de los MHC II, a los linfocitos T. El proceso de captación de alérgenos es muy activo en los sujetos alérgicos, en parte, gracias a la interacción del alérgeno con la IgE unida a su receptor de alta afinidad (FcεRI) [14].

La polarización de las células T hacia un fenotipo Th2, depende, además de la presentación antigénica, de la presencia de IL-4, así como de un estricto control epigenético, que activa los factores de transcripción maestros STAT6 y GATA3. La fuente de IL-4 es aportada fundamentalmente los mastocitos y basófilos [96]. Además, los linfocitos Th2 secretan citocinas como la IL-5, IL-4 e IL-13, desencadenando el reclutamiento de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y basófilos, amplificando el proceso inflamatorio. Esta segunda fase, a nivel clínico, se caracteriza por la presencia de tos, sibilancias y disnea que constituyen un cuadro de broncoconstricción aguda.

- *Biomarcadores y tratamiento*

La piedra angular para el tratamiento sintomático del asma es la terapia con anti-inflamatorios, especialmente corticosteroides, en combinación con modificadores de la actividad de los cisteinil-leucotrienos y broncodilatadores, como agonistas de receptores beta-2 adrenérgicos de corta, y sobre todo de larga duración, manteniendo controladas las manifestaciones de la enfermedad

INTRODUCCIÓN

durante prolongados periodos de tiempo [97]. El uso de corticosteroides está ampliamente extendido gracias a sus efectos beneficiosos a través de la modulación de la secreción de citocinas Th2 [98], la expresión del factor de transcripción maestro GATA-3 [99] o la secreción de moco [100], entre otros. El principal problema de este tratamiento radica en la falta de especificidad y el amplio espectro de su actividad; pero, a pesar de estas contraindicaciones, los corticosteroides son relativamente efectivos en individuos con evidencias de presentar inflamación de tipo Th2, manifestada por un aumento de los niveles de periostina en las vías respiratorias y de la inflamación eosinofílica, evaluada tanto por el número de eosinófilos en esputo, como por el valor de la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO), pudiendo considerarse a estos tres parámetros como biomarcadores de este fenotipo asmático [101-103].

Más allá de los efectos inespecíficos de los corticosteroides, el tratamiento con moléculas que inciden sobre componentes que forman parte de la vía Th2, como los anticuerpos monoclonales anti-IgE, los inhibidores del receptor α de la IL-4 (IL-4R α) y las estrategias para bloquear IL-5 e IL-13, ha confirmado la implicación de las citocinas Th2 en la propagación de la respuesta asmática específica de alérgeno [104-106].

De todas estas aproximaciones terapéuticas, el anticuerpo humanizado anti-IgE (omalizumab) es el único agente biológico aprobado para el tratamiento del asma ya que controla las reacciones fisiológicas tanto de la fase temprana como de la fase tardía de la respuesta alérgica y de la inflamación eosinofílica [104].

En el caso del uso de antagonistas de IL-4R α y anticuerpos anti-IL-13 como el lebrikizumab, se han obtenido resultados muy esperanzadores en pacientes con asma leve y en pacientes con fenotipo asmático de moderado a grave [107].

El éxito de estas terapias experimentales puede deberse al reciente descubrimiento de una serie de polimorfismos en el propio IL-4R α , que favorecen la respuesta farmacogenética de este tipo de inhibidores [108]. En contraste, el anticuerpo monoclonal anti-IL-5, a pesar de reducir drásticamente los niveles de eosinófilos en sangre, no ha sido eficaz en la supresión de la respuesta alérgica que caracteriza a este fenotipo asmático [109].

B) Asma eosinofílico persistente de inicio tardío

La presencia de elevados niveles de eosinófilos, tanto en el esputo, como en sangre periférica, es la principal característica de este fenotipo. En general, los pacientes se clasifican en este grupo cuando el número de eosinófilos en esputo es superior al 2% del total de células inflamatorias, y se estima que casi el 50% de los individuos con asma de moderado a grave se incluyen en él [101], además se relaciona con la presencia de sinusitis, pólipos nasales, y menos frecuentemente, con la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA). La persistencia de los elevados niveles de

eosinófilos, a pesar del tratamiento con corticosteroides orales o inhalados durante un periodo de al menos cinco años, se asocia con un inicio de la enfermedad en la etapa adulta, restándole importancia al proceso alérgico y concediéndosela al eosinófilo dentro de la respuesta de tipo 2 [90, 110, 111].

La falta de síntomas alérgicos sugiere el desarrollo de un proceso inflamatorio de tipo Th2 en los pulmones independiente del mecanismo mediado por IgE [112]. Algunos individuos incluidos en este fenotipo muestran neutrofilia en el esputo, además del proceso eosinofílico descrito, lo que indica una posible interacción de varios mecanismos inmunes que contribuyen con nuevas citocinas como IL-17 o IL-33 [113, 114].

- *Biomarcadores y tratamiento*

Las citocinas Th2 como IL-13 e IL-5 son biomarcadores indiscutibles de este fenotipo, detectadas en grandes cantidades en las vías respiratorias inferiores y en los pólipos nasales [115, 116]. A estas citocinas se deben sumar otras moléculas también implicadas en la respuesta inmune Th2 y que están elevadas en muchos de estos pacientes, incluyendo la 15-lipooxigenasa-1 y su producto el ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico, la enzima inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) y las eotaxinas [117, 118].

La presencia de citocinas Th2 y eosinófilos fomenta la activación de la vía de los cisteinil-leucotrienos, y la elevación de los valores de FeNO, constituyendo dos nuevos biomarcadores que definen este fenotipo [90, 119].

Los eosinófilos normalmente responden a la terapia con corticoides sufriendo apoptosis, pero en los pacientes con asma persistente no son eliminados, lo que agrava la enfermedad. La mejoría de estos pacientes radica en la supresión de las citocinas Th2, IL-4, IL-13 e IL-5 que contribuyen inequívocamente al mantenimiento de la eosinofilia [120]. En este sentido, el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-IL-5 en pacientes con asma grave y persistente, de aparición casi exclusiva en la edad adulta, ha sido muy efectivo, no sólo disminuyendo el número de eosinófilos en sangre y pulmón, sino también reduciendo las exacerbaciones y los requerimientos de corticoesteroides sistémicos [121].

1.3.1.2.2. Fenotipos asmáticos no-Th2

Muchos de los individuos que debutan con asma de moderado a severo en la edad adulta, con ausencia de alergias en su historia infantil y una menor obstrucción e hiperreactividad de las vías aéreas, se engloban dentro de esta categoría que representa casi un 50% de los pacientes que no responden positivamente al tratamiento con corticosteroides [103]. Dos de los fenotipos más

INTRODUCCIÓN

comunes dentro de este grupo de pacientes son el asma relacionada con la obesidad y el asma neutrofílica.

A) Asma relacionada con la obesidad

Existen múltiples estudios que asocian la obesidad con un estado pro-inflamatorio general en el que participan factores como el $\text{TNF}\alpha$, la IL-6 y las leptinas, así como con la necesidad de un mayor gasto energético durante la respiración que conducen al establecimiento de un fenotipo asmático grave y persistente independiente de la respuesta inmune Th2 [122]. La estrategia terapéutica más eficaz en este tipo de pacientes es la pérdida de peso [123].

B) Asma neutrofílico

La presencia de neutrófilos en los pulmones se relaciona con una menor función pulmonar, una mayor retención del aire, engrosamiento de las paredes respiratorias y aumento de la expresión de metaloproteinasas de la matriz [124-126]. La neutrofilia se ha asociado tradicionalmente con un fenotipo de asma grave, aunque en la actualidad sigue sin existir un consenso sobre los parámetros que definen a este fenotipo.

En este caso, el tratamiento con corticosteroides es poco efectivo puesto que inhibe la apoptosis de los neutrófilos, manteniendo su estado activado [127]. En cambio, se ha visto que el tratamiento con antibióticos macrólidos reduce la expresión de los marcadores neutrofílicos [128].

Dado que la inflamación mediada por células Th17 se ha relacionado con la activación de neutrófilos, recientemente, se han generado muchos modelos animales que expresan IL-17 en grandes cantidades, cursan con neutrofilia y son resistentes al tratamiento con corticosteroides, para intentar dilucidar los mecanismos que sustentan la manifestación de este fenotipo e iniciar los primeros ensayos clínicos [113, 129].

1.3.2. BRONQUITIS EOSINOFÍLICA NO- ASMÁTICA

La bronquitis eosinofílica no asmática (BENA) se describió por primera vez en 1989 por Gibson y colaboradores, en un grupo de pacientes con tos crónica persistente e importante eosinofilia en esputo, vinculada a la presencia de citocinas Th2 en las vías respiratorias. A diferencia de los pacientes asmáticos, no presentaban hiperreactividad bronquial y las pruebas funcionales pulmonares eran normales [130]. Suele manifestarse en individuos de mediana edad y generalmente no fumadores.

En contraste con el amplio conocimiento que existe actualmente sobre el asma, poco se conoce sobre la etiología y la evolución natural de la BENA. Se piensa que puede ser originada por la

exposición a alérgenos comunes u ocupacionales [131], así como por fármacos [132], e incluso por infecciones virales [133].

Una de las características principales de la BENA es la presencia de eosinófilos. Sin embargo, la existencia de eosinófilos en las vías respiratorias en este caso no conduce a la obstrucción del flujo respiratorio como sí ocurría en la enfermedad asmática. La ausencia de hiperrespuesta de las vías respiratorias en la BENA ha sido investigada exhaustivamente, generando distintas hipótesis. Actualmente, la hipótesis más aceptada es la relacionada con la microlocalización de los mastocitos en las vías respiratorias. La presencia de los mastocitos en la musculatura lisa de las vías respiratorias en pacientes asmáticos y su ausencia en individuos con BENA, en los que los mastocitos se localizan en una zona más superficial cercana al endotelio, parece explicar la falta de hiperreactividad en estos pacientes.

Otro factor que está implicado en la inexistencia de hiperrespuesta de las vías en la BENA es la prostaglandina E_2 (PGE_2), un mediador lipídico derivado del metabolismo del ácido araquidónico.

Nuestro grupo descubrió un aumento de los niveles de prostaglandina E_2 (PGE_2) en las vías respiratorias de los pacientes con BENA en comparación con los niveles de los asmáticos, y asoció dicha elevación con un efecto broncoprotector, mediante la inhibición de la capacidad proliferativa de las células musculares lisas bronquiales a través de los receptores EP_2 y EP_4 [134].

1.3.2.1. Tratamiento

Afortunadamente, la evolución de la BENA es benigna y autolimitada; normalmente los pacientes mejoran con el tratamiento con corticoesteroides inhalados y antitusígenos de acción central como la codeína y el dextrometorfano, los cuales son efectivos en la supresión de la tos aguda y crónica.

1.3.3. ESOFAGITIS EOSINOFÍLICA

La esofagitis eosinofílica (EoE) es una enfermedad crónica del esófago, de origen inmune y mediada por antígeno. Presenta síntomas clínicos relacionados con la disfunción esofágica, como son la disfagia, la impactación del bolo alimenticio, dolor abdominal, vómitos y otros síntomas relacionados con el reflujo gastroesofágico. Histológicamente se caracteriza por un infiltrado predominante de eosinófilos.

El diagnóstico definitivo se acomete mediante una endoscopia que valora las características típicas de la EoE (p.e. surcos y/o traquealización del esófago, presencia de placas de moco blanquecinas) recogidas en la figura 5; se realizan entre 2 y 4 biopsias de las regiones proximal y distal del esófago que confirmen la presencia de más de 15 eosinófilos a un aumento de 400x en el microscopio; y la falta de respuesta histológica tras dos meses de tratamiento con el inhibidor de la bomba de protones [135].

INTRODUCCIÓN

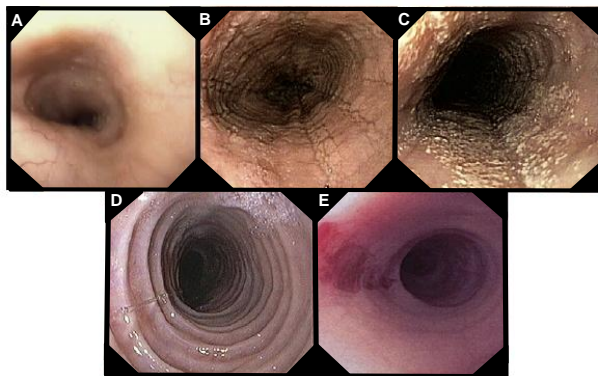


Figura 5. Rasgos endoscópicos de la EoE. A, Esófago normal. B, Surcos esofágicos. C, Placas de moco blanquecinas. D, Traquealización del esófago. E, Esófago estrechado con desgarro de la mucosa tras la endoscopia (Liacouras CA. 2011 J Allergy Clin Immunol. 128(1): 3-20).

El desencadenamiento de la EoE parece estar ocasionado por la activación de una reacción alérgica frente a ciertas proteínas de los alimentos. La demostración de que la alergia alimentaria es una de las causas principales del desarrollo de la EoE ha sido llevada a cabo de tres formas diferentes [136]:

1. Eliminando los alimentos de la dieta contra los que el paciente genera IgE específica.
2. Sometiendo al paciente a una dieta de eliminación de los 6 alimentos que más comúnmente están implicados en las reacciones alérgicas (leche, soja, huevos, trigo, cacahuete, y marisco)
3. Iniciando el tratamiento con una dieta elemental basada en aminoácidos cristalinos libre de los epítomos alérgicos de los alimentos, y a continuación añadiendo poco a poco diferentes grupos de alimentos para determinar cuáles son los responsables de las características clinicopatológicas de la enfermedad.

En los tres casos, la modificación de la dieta ha generado una mejoría de los síntomas en los pacientes.

La patogénesis de la EoE sigue sin resolverse completamente, pero las evidencias tanto clínicas como mecanísticas apuntan al establecimiento de una respuesta inmune Th2 mediada por alérgenos exógenos. La prevalencia de la EoE varía estacionalmente y se correlaciona con los niveles polínicos, lo que también implica a los aeroalérgenos en la etiología de la enfermedad [137]. La participación activa de los eosinófilos en las reacciones alérgicas inflamatorias, explica en parte la acumulación de estas células en el esófago cuando los pacientes sensibilizados son expuestos a grandes concentraciones de alérgenos. Frecuentemente los pacientes son alérgicos a diversos

alimentos y alérgenos aéreos, tienen una historia familiar de atopia e inexplicablemente hasta la fecha, se asocia predominantemente con el sexo masculino. A pesar de la larga lista de alérgenos descritos como causantes de la EoE, aún no se ha establecido ninguno como alérgeno específico del origen de la enfermedad, sin embargo, la infiltración de los eosinófilos en el esófago sí se ha relacionado directamente con alérgenos del trigo y la leche de vaca, en pacientes con EoE [138].

La maduración, migración y activación de los eosinófilos se controla por citocinas como IL-5 e IL-13 y el factor GM-CSF. Estas células se extravasan desde la circulación sanguínea y penetran en la mucosa esofágica, proceso que va a estar controlado en todo momento por las citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) que actúan como quimioatrayentes, induciendo la expresión de la β -integrina VLA-4. La función de las citocinas Th2 en el desarrollo de la EoE es indiscutible, y varios grupos están dirigiendo sus esfuerzos en desarrollar terapias cuyas dianas son moléculas específicas de esta respuesta, como la IL-5, IL-13 o la eotaxina-3 [139, 140], ya que esta última es uno de los potenciales marcadores de la enfermedad. Su expresión es muy elevada tanto en los tejidos dañados como en las células de sangre periférica.

De hecho, se ha descrito un polimorfismo en un único nucleótido (2,496 T>G) dentro de la región 3' no codificante del gen de la eotaxina-3, el cual ha sido asociado con la susceptibilidad a padecer EoE [141]. Otro de los genes implicados recientemente en la etiología de la EoE es el factor TSLP (linfopoyetina del estroma tímico), identificándose varios polimorfismos asociados directamente con la aparición de la enfermedad, algunos de ellos relacionados con la alta prevalencia de la EoE en el sexo masculino [142].

Además de las citocinas Th2 y los factores asociados típicamente a las respuestas de tipo 2, deben tenerse en cuenta otras citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-17, que se encuentran elevadas en estos pacientes tanto en suero como en el tejido esofágico [143].

1.3.3.1. Tratamiento

Existe una gran controversia en relación al establecimiento de un tratamiento adecuado en los pacientes con EoE. Al igual que otras enfermedades alérgicas, la EoE es una condición crónica en la que la infiltración de eosinófilos y los síntomas típicos son recurrentes si el tratamiento no se mantiene. Dado que la mayoría de los niños y adultos con EoE son atópicos y han sufrido otro tipo de enfermedades alérgicas (p.e. asma, rinoconjuntivitis, eczema), actualmente las terapias que se aplican en pacientes con EoE incluyen dietas de eliminación de alimentos y tratamiento con esteroides, que tienen efecto en la respuesta global inflamatoria y en las citocinas producidas por los eosinófilos [144]. Por otro lado se ha visto que en varios estudios llevados a cabo en diferentes grupos de pacientes, el uso del anticuerpo monoclonal humanizado específico de IL-5 (mepolizumab) ha producido la reducción de la inflamación esofágica, pero sin apenas alivio de los síntomas [145-147].

1.4. SEÑALIZACIÓN DE CITOCINAS

Las citocinas desempeñan un papel crucial en el control de la respuesta inmune, regulando el desarrollo, la diferenciación, y la función de células mieloides y linfoides. El término citocina hace referencia a una amplia colección de factores secretados que van a señalizar a través de diferentes receptores. Dentro de este gran grupo, las superfamilias de citocinas-receptores I y II que incluyen receptores que unen interferones, muchas de las interleucinas descritas, y factores estimuladores de colonias, utilizan el mismo mecanismo de señalización: la vía *Janus Kinase/signal transducers and activator of transcription* (JAK-STAT) [148].

Otras citocinas como el factor de necrosis tumoral, IL-1 e IL-8, ó el factor transformante de crecimiento, se unen a diferentes clases de receptores y no utilizan la ruta JAK/STAT.

El reconocimiento de citocinas por el receptor apropiado induce la oligomerización o reorientación de las subunidades del receptor y, de este modo se inicia la transmisión de una señal desde el exterior al interior de la célula diana.

Las regiones intracelulares de los receptores de tipo I y II, no tienen ninguna actividad kinasa intrínseca y por tanto, van a depender de efectores que se asocien con ellos, como son las kinasas Janus (JAKs) para iniciar la cascada de señalización.

Existen cuatro kinasas janus (JAKs) descritas: JAK1, JAK2, JAK3, y la tirosina kinasa 2 (TYK2), todas ellas conteniendo un dominio SH2 (*Src homology 2*) y un dominio pseudokinasa. La oligomerización o reorientación del receptor da lugar a la transfosforilación, seguido de la activación de las moléculas JAK que se encuentran constitutivamente asociadas a unos dominios intracelulares ricos en prolina de las subunidades del receptor (Box1/Box2).

Las proteínas JAKs activadas fosforilan residuos de tirosina en las regiones intracelulares del receptor y así generan sitios de anclaje para efectores que tengan dominios que reconocen sitios con tirosinas fosforiladas. En particular, las proteínas “señalizadoras de la transducción y activadoras de la transcripción” (STAT), son uno de los efectores corriente abajo mejor caracterizados de la vía señalización de JAK.

Las proteínas STATs son reclutadas al receptor fosforilado a través de su dominio SH2, que reconoce las tirosinas fosforiladas. De esta manera, STAT se localiza en las proximidades de la kinasa JAK activada. Las proteínas STATs activadas (STAT1-6), son fosforiladas en sus residuos tirosina o serina por las proteínas JAKs, y forman dímeros para translocarse al núcleo y regular la expresión génica uniéndose al ADN (Figura 6).

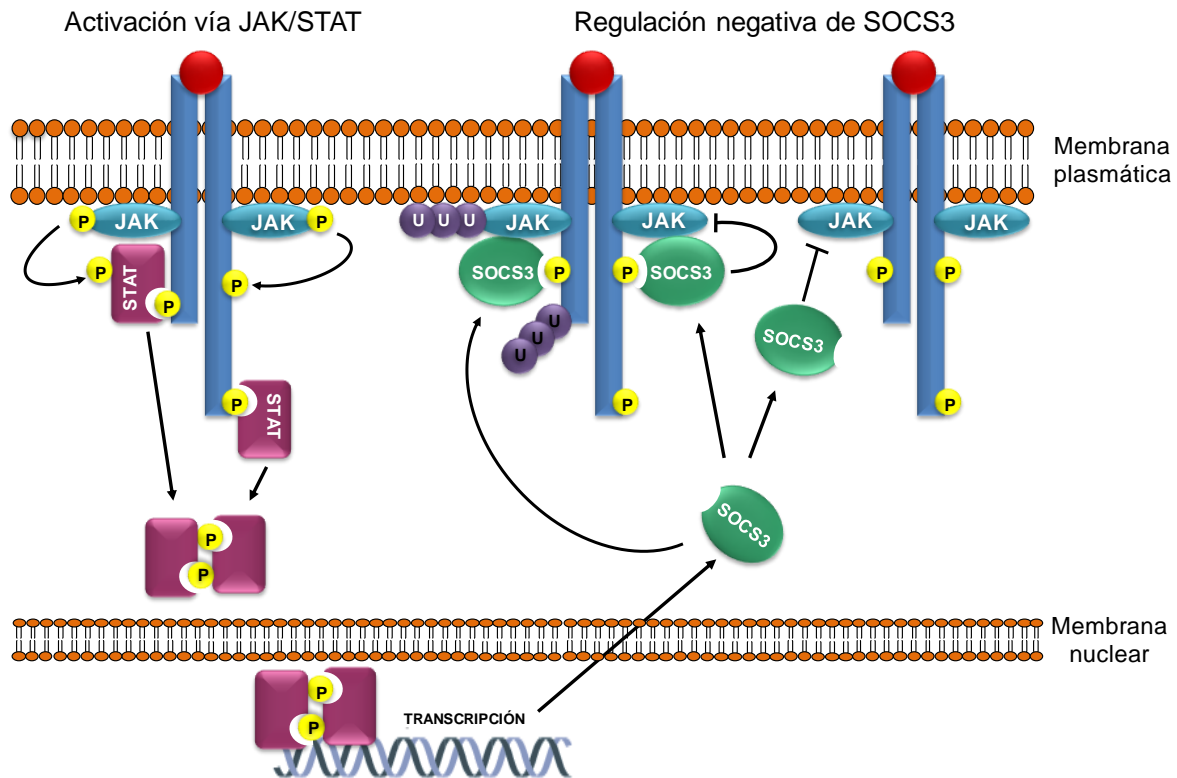


Figura 6. Esquema de la vía de señalización JAK/STAT y su regulación negativa. La unión de citocinas a su ligando provoca la oligomerización del receptor. Las proteínas JAKs, que se encuentran asociadas selectivamente a los dominios intracelulares del receptor se activan, y subsecuentemente se produce la transfosforilación de unos a otros y de los dominios citoplásmicos del receptor. La fosforilación de residuos de tirosina específicos del receptor por parte de JAK, crea sitios de unión para los dominios SH2 de los “señalizadores de la transducción y activadores de la transcripción” (STAT). La fosforilación de STAT por parte de JAK facilita la dimerización de STAT o la reorientación de dímeros STAT, facilitando su translocación al núcleo donde actúan como factores activadores de la transcripción.

1.5. PROTEÍNAS SUPRESORAS DE LA SEÑALIZACIÓN DE CITOCINAS

Tanto la magnitud como la duración de la activación de las rutas de señalización, deben estar sometidas a un estricto control para evitar respuestas patogénicas. Para ello, existen sistemas de regulación negativa de la señalización, esenciales en la homeostasis de los procesos inmunológicos. Además, estos mecanismos de inhibición son importantes para concretar el destino y la diferenciación de las células, modulando el balance de muchas rutas de transducción.

Los reguladores negativos de las JAKs son la familia de proteínas conocida como supresores de la señalización de citocinas (SOCS) [149, 150]. Son una familia de proteínas intracelulares formada por ocho miembros, hasta el momento: CIS (*cytokine-inducible SH2*), SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6 y SOCS7. Estas proteínas, a pesar de que comparten homología en algunos de sus dominios, son evolutivamente muy diferentes.

INTRODUCCIÓN

Su expresión se induce por la activación de la vía JAK/STAT, entre otras, e inhiben la cascada de activación creando un bucle de retroalimentación negativa. Las proteínas SOCS pueden inhibir esta cascada de señalización mediante cuatro vías distintas:

- Bloqueando el reclutamiento de STAT al receptor de citocinas.
- Marcando el receptor para que sea degradado vía proteasoma.
- Uniéndose a las proteínas JAKs e inhibiendo directamente la actividad kinasa.
- Marcando a las proteínas JAKs para que sean degradadas por el proteasoma.

Además de controlar la activación de la vía de señalización JAK/STAT, mediante estudios en ratones se han revelado otras muchas actividades de las proteínas SOCS en diversos procesos biológicos, como son: la maduración de células dendríticas, la polarización de macrófagos, la diferenciación de células T ó la inhibición de respuestas virales [151].

1.5.1. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE SUPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS SOCS

Las proteínas SOCS (Figura 7), contienen un dominio central SH2 (*src homology 2*) que determina la diana de reconocimiento de cada proteína SOCS y CIS, gracias a su capacidad de unir residuos de tirosina fosforilados en péptidos y proteínas. El dominio SH2 de SOCS1 directamente se une a JAK, mientras que los dominios SH2 de CIS, SOCS2, y SOCS3 se unen a residuos de tirosina fosforilados de los receptores de citocinas activados.

Una de las características más especiales del dominio SH2 de SOCS3, es la existencia de un bucle sin estructura de unos 35 aminoácidos. Esta inserción tiene las características de un motivo enriquecido en los aminoácidos de prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST) [152].

Los motivos PEST se identificaron inicialmente en proteínas que presentaban altas tasas de renovación, probablemente porque dichos motivos estimulan la degradación proteolítica, fundamentalmente, vía proteasomal.

La eliminación del motivo PEST da lugar a un aumento de la vida media de SOCS3, sin afectar a la capacidad de unión de péptidos con residuos tirosina fosforilados. Adyacente al dominio SH2, en su extremo N-terminal, se encuentra la secuencia conservada ESS (*extended SH2 domain*) con estructura de α -hélice, que aumenta la afinidad de unión del dominio SH2 a los péptidos fosforilados diana.

El extremo carboxi-terminal consta de 40 aminoácidos conservados constituyendo la caja SOCS. La caja SOCS interacciona con la elonguina B y la elonguina C y, junto con otras moléculas, recluta la ubiquitina transferasa E2. De este modo, la familia de proteínas SOCS, como otras proteínas que también contienen la caja SOCS, actúan como ubiquitina ligasas E3 y median la degradación de proteínas que estén asociadas con estos miembros a través de la región N-terminal.

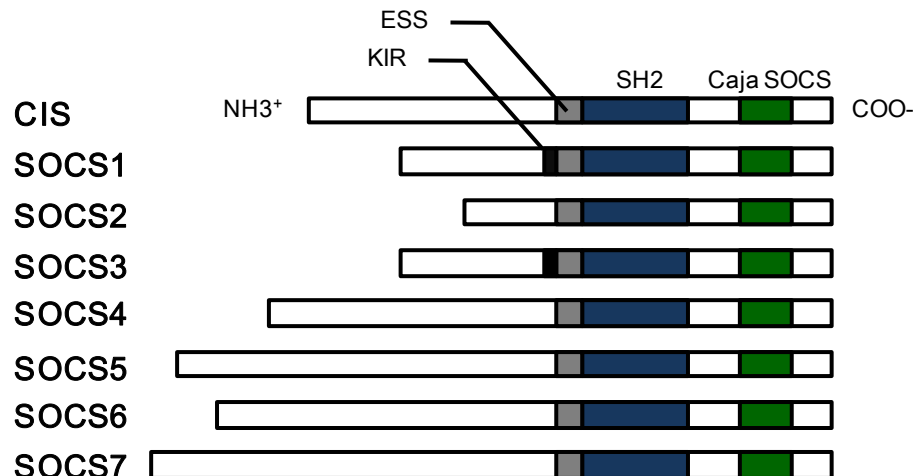


Figura 7. Estructura esquemática de los 8 miembros de la familia SOCS. La caja SOCS y el dominio SH2 se encuentran conservados. SOCS1 y SOCS3 son los únicos que contienen el dominio KIR de inhibición.

Además de suprimir la señalización, mediante ubiquitinización del complejo de proteínas implicadas en la vía, SOCS1 y SOCS3 son capaces de inhibir directamente la actividad tirosina kinasa de las proteínas JAKs, a través de su región inhibidora de kinasa (KIR), que se compone de 12 aminoácidos. Recientemente se ha desvelado el mecanismo de inhibición de las JAKs kinasas por SOCS3 [153].

Haciendo uso de espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de JAK2 y el complejo SOCS, se descubrió que SOCS3 se une e inhibe directamente los dominios catalíticos de JAK1, JAK2 y TYK2, los cuales poseen un motivo GQM conservado evolutivamente (Figura 8).

Los experimentos de cinética revelaron que SOCS3 es un inhibidor no-competitivo de JAK2, bloqueando la capacidad del dominio JH1 de JAK2 para transferir el fosfato de la tirosina, pero no su capacidad de hidrolizar ATP, aumentando de este modo la transferencia del grupo fosfato al agua. Los supresores SOCS3 y SOCS1 son los únicos miembros de la familia que tienen la capacidad de inhibir JAK directamente (Figura 8). Esta característica única, les hace ser los dos supresores más potentes de la señalización de citocinas. Además, ambos contienen alteraciones de secuencia en la caja SOCS que les hacen más ineficaces a la hora de reclutar los componentes para la señalización de degradación vía proteasoma [154].

Estos hallazgos, unido a la gran similitud de secuencia existente entre ellos, les ha llevado a ser clasificados como una sub-clase dentro de las proteínas SOCS.

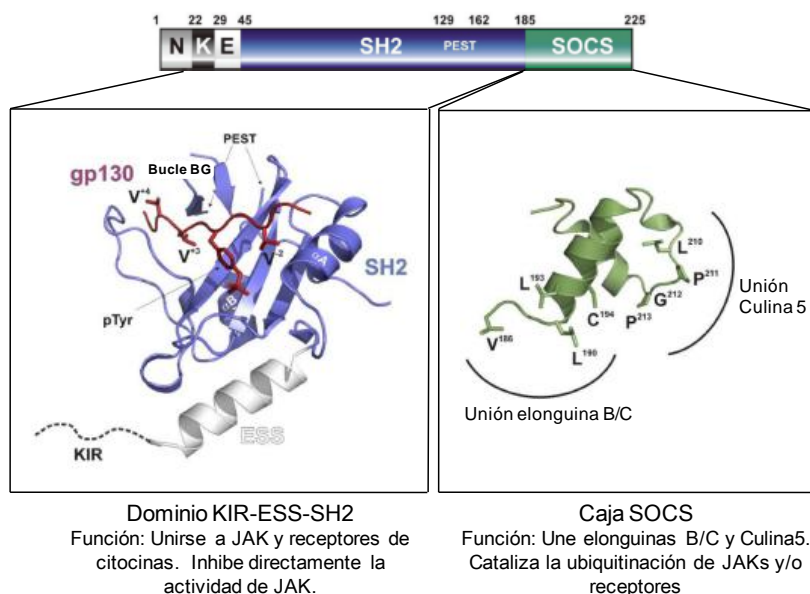


Figura 8. Estructura de SOCS3. SOCS3 se puede dividir en tres dominios: el dominio N-terminal (residuos 1-29, incluyendo los residuos KIR del 22-29), el dominio SH2 extendido (residuos 30-185) y la caja SOCS (residuos 186-225). Se han caracterizado las estructuras atómicas del dominio SH2 (azul) que incluye la hélice ESS (blanca) de SOCS3 unido a un residuo de fosfotirosina de la subunidad gp130 del receptor de citocinas (rojo). La estructura de la caja SOCS se representa en la imagen derecha en verde, resaltando los residuos más importantes. Tanto la región inhibidora de kinasas (KIR) como el motivo PEST no presentan estructura. (Figura modificada de Babon JJ. 2012 Growth Factors. 30(4):207-219).

1.5.2. REGULACIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA SOCS

La transcripción de los genes de la familia SOCS, puede ser iniciada no sólo por citocinas, como las de la familia γc [155, 156], gp130 o del IFN [156], sino también por diversos factores de origen no linfocitario [157] (Tabla 3).

La regulación de las proteínas SOCS se da tanto a nivel transcripcional, como transduccional y post-transduccional. Las proteínas SOCS se regulan mediante procesamiento alternativo (*splicing*) y modificando la estabilidad de su ARNm. SOCS1 presenta dos codones de iniciación, uno de los cuales origina una terminación prematura de la transducción. La estabilidad del ARNm de SOCS1 a su vez, puede estar regulada por la adición de nucleótidos de guanina modificados al extremo 5' de la molécula de ARNm [157].

Por otro lado, SOCS3 puede excluir un exón que codifica para un sitio de ubiquitinación el cual promueve su degradación [158], de igual manera que actuaba el motivo PEST descrito en el apartado anterior, de forma post-transduccional. Así mismo, la interacción de SOCS3 con las elonguinas B y C puede limitar su tasa de renovación [159].

| SOCS | FACTORES INDUCTORES | ELIMINACIÓN COMPLETA DEL GEN | EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DEL GEN |
|-------|---|---|--|
| CIS | IL-2, IL-3, IL-6, IL-9, IL-10, CNTF, EGF, eritropoyetina, GH, GM-CSF, Leptina, PRL, TPO, TSLP | ? | <ul style="list-style-type: none"> • ↓ Lactancia • ↓ NK y ↓ células T$\gamma\delta$ • ↓ señalización de IL-2 |
| SOCS1 | IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-21, CNTF, CT1, EPO, G-CSF, GH, IFN α/β , IFN γ , Insulina, LIF, PRL, SCF, TNF α , TSH | <ul style="list-style-type: none"> • Letalidad neonatal • ↑ Producción de IFNγ • ↑ Linfopenia e infiltrados hematopoyéticos en todos los órganos | <ul style="list-style-type: none"> • ↓ CD8$^{+}$/↑CD4$^{+}$ • ↓ Células T$\gamma\delta$ • Activación espontánea y apoptosis en las células T periféricas |
| SOCS2 | IL-2, IL-6, CNTF, EPO, GH, Insulina, PRL | Gigantismo | Gigantismo |
| SOCS3 | IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-22, IL-23, IL-27, CNTF, CT1, EGF, EPO, GH, IFN- α/β , IFN γ , Insulina, Leptina, LIF, OSM, PDGF, PRL, TGF- β , TNF- α , TPO, TSH | <ul style="list-style-type: none"> • Letal para el embrión (deficiencia en la formación de la placenta) • ↑ Eritrocitosis | Letal para el embrión, |
| SOCS4 | EGF | ? | ? |
| SOCS5 | EGF | ? | ↑Th1/↓Th2 |
| SOCS6 | SCF, Insulina | Retraso en el crecimiento | ? |
| SOCS7 | Simvastina | <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Hidrocéfalo • Retraso en el crecimiento • ↑ Aclarado de glucosa • ↑ Hipoglucemia | ? |

Tabla 3. Regulación de la familia de proteínas SOCS. Las columnas muestran los factores que inducen a cada miembro de la familia de proteínas SOCS, los fenotipos expresados en ratones debido a la pérdida completa de alguno de los genes SOCS, y los cambios que ocurren si, por el contrario, se expresa en exceso cada una de las proteínas SOCS en ratones (expresión transgénica del gen). CIS, proteína SH2 inducida por citocina; CNTF, factor neurotrófico ciliar; CT1, cardiotrofina-1; EGF, factor de crecimiento epidérmico; G-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos; GH, hormona de crecimiento; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; INF- α/β , interferon alfa/beta; IFN- γ , interferon gamma; LIF, factor inhibidor de leucemia; OSM, oncostatina M; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas, PRL, prolactina; SCF, factor celular *stem*; SOCS, supresor de la señalización de citocinas; TGF- β , factor de crecimiento transformante beta; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa; TPO, trombopoyetina; TSH, tirotropina; TSLP, linfopoyetina del estroma tímico.

La fosforilación por parte de las kinasas PIM en una región de las proteínas SOCS denominada sitio de integración proviral, bloquea también la tasa de renovación de SOCS1 y SOCS3, aumentando su estabilidad y su eficiencia inhibidora[160].

En cambio, la fosforilación de la caja SOCS puede bloquear la interacción entre los miembros de la familia SOCS y la elonguina, favoreciendo así su degradación [159].

INTRODUCCIÓN

Otro de los mecanismos de regulación post-transduccional, son los cambios de localización subcelular, que parece potenciar la inhibición de la señalización de citocinas. Los miembros, CIS, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS6 y SOCS7 son capaces de translocarse al núcleo [160, 161]. SOCS1 además es capaz de asociarse al complejo organizador de microtúbulos, lo cual puede ser relevante en la regulación de su función [162].

Por último, las proteínas SOCS también pueden ser degradadas por otros miembros de la propia familia SOCS, como SOCS2, SOCS6 y SOCS7. Por ejemplo, SOCS2 promueve la degradación vía proteasoma de SOCS1 y SOCS3, a través de su caja SOCS [163].

1.5.3. SOCS3

SOCS3 tiene un peso molecular de aproximadamente 26 kDa y en el genoma humano, su gen se localiza en el cromosoma 17(q25.3). La presencia de SOCS3 es fundamental en el desarrollo embrionario, ya que la disrupción del gen de SOCS3 provoca la letalidad del embrión al inhibir la señalización llevada a cabo por el factor inhibidor de leucemia (LIF), implicado en la diferenciación de los trofoblastos que conforman la placenta [164].

SOCS3 se une específicamente a las siguientes tirosinas fosforiladas de receptores de citocinas: el residuo fosforilado de tirosina 757 (Tyr757) de la subunidad gp130, el residuo Tyr800 de la subunidad $\beta 2$ del receptor de IL-12, y la Tyr985 del receptor de leptina. Por lo tanto, SOCS3 actúa como un supresor relativamente específico para STAT3 y STAT4 [165, 166]. SOCS3 no inhibe la señalización de STAT3 mediada por IL-10 debido a que SOCS3 no se une a los receptores de IL-10.

De este modo, IL-10 es capaz de inducir la activación de STAT3 de forma prolongada, mientras que la activación de STAT3 mediada por IL-6 es transitoria, diferenciándose así los efectos anti-inflamatorios de la actividad de IL-10, frente a los efectos pro-inflamatorios de IL-6 [167].

Además de las proteínas STATs, SOCS3 es capaz de inhibir otras vías de señalización como la vía Ras/ERK y la vía de la fosfatidil-inositol 3 kinasa (PI3K), que afectan a la proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular. En este caso, la estimulación por citocinas o factores de crecimiento provoca la fosforilación en la tirosina 221 de SOCS3, que a su vez interacciona con la proteína RasGAP, dando lugar a una activación constitutiva de ERK [168].

1.5.3.1. Funciones de SOCS3 en células inmunes

1.5.3.1.1. SOCS3 en macrófagos y células dendríticas

El papel beneficioso de SOCS3 en el linaje mieloide, restringiendo la respuesta inflamatoria en enfermedades tanto infecciosas como autoinmunes, ha sido ampliamente documentado en una gran variedad de modelos animales de esclerosis múltiple, artritis, rechazo de trasplantes, daño pulmonar, aterosclerosis y shock séptico [169-171].

Existen dos subpoblaciones bien definidas de macrófagos que ejercen funciones prácticamente antagónicas: los macrófagos clásicamente activados (M1) cuya función es esencialmente efectora y los macrófagos activados alternativamente (M2) con un perfil de expresión más regulador [172]. Se ha postulado que la regulación de la polarización de macrófagos está controlada en parte por la expresión de SOCS3, ya que recientemente se ha descrito que la deficiencia de SOCS3 induce el fenotipo M1 en los macrófagos y por lo tanto la inflamación [172].

En el caso de las células dendríticas la expresión transgénica de SOCS3 suprime la diferenciación a Th17 tanto *in vivo* como *in vitro*, además aumenta la producción de IL-10 y reduce los niveles de IL-12, IFN γ e IL-23 [169].

1.5.3.1.2. SOCS3 en células T cooperadoras

Los linfocitos T cooperadores, positivos para el marcador de superficie CD4, se diferencian en varios linajes dependiendo de las condiciones de polarización que existan en un determinado ambiente. Los cuatro fenotipos más conocidos y en los que se ha estudiado la implicación de SOCS son: Th1, Th2, Th17 y Treg. De todos los miembros de la familia de supresores, SOCS1, SOCS3 y SOCS5 juegan el papel más significativo en la diferenciación de los linfocitos T inmaduros (Figura 9).

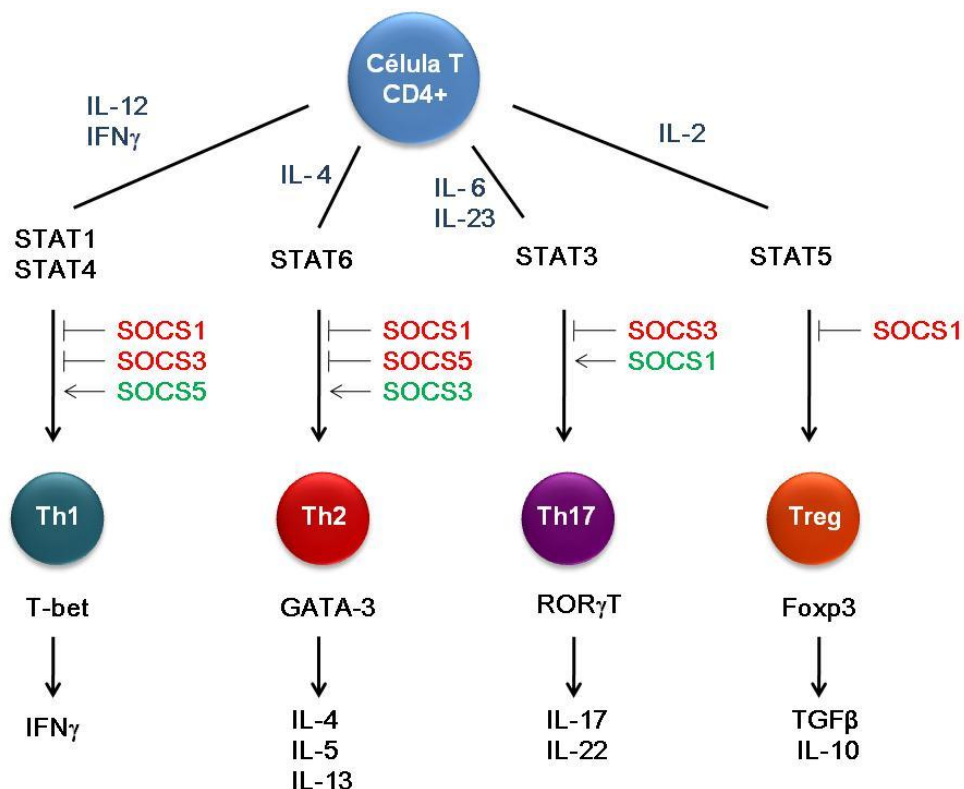


Figura 9. Participación de SOCS en la diferenciación de los linfocitos T cooperadores. La diferenciación de los linfocitos T *naïve* a uno de los subtipos funcionales (células Th1, Th2, Th17 y Treguladoras) depende de la acción de las citocinas como se muestra en la figura. SOCS1 y SOCS3 regulan las vías indicadas en el esquema, dictando la diferenciación de las células T CD4⁺.

INTRODUCCIÓN

La expresión de SOCS3 en células T se correlaciona de forma positiva con la gravedad de varias enfermedades alérgicas como el asma y la dermatitis atópica [156]. El aumento de expresión de SOCS3 promueve dichas respuestas alérgicas, dado que la expresión transgénica de SOCS3 en células T inhibe el desarrollo hacia un fenotipo Th1 y promueve el Th2. Esta mayor diferenciación a Th2 es debida a la supresión por parte de SOCS3, de la señalización de IL-12 que promueve la diferenciación a Th1 a través de STAT4.

En este sentido se ha visto que los ratones transgénicos para SOCS3 presentan una mayor predisposición a ser infestados por *Leishmania major*, donde una respuesta Th1 es necesaria para la erradicación de este microbio [173].

La reducción de la expresión de SOCS3 se ha estudiado en múltiples modelos y enfermedades. La ausencia de SOCS3 en células T reduce la eosinofilia en modelos murinos de asma alérgico [174, 175], pero promueve la diferenciación de las células T al fenotipo Th17 [176]. La inflamación vascular y las lesiones ateroscleróticas también se ven reducidas en modelos de inhibición de SOCS3 en células T, aumentándose en ambos casos la producción de IL-17 [177].

En resumen, la ausencia de SOCS3 en células T cooperadoras da lugar a una inhibición de la respuesta Th2, aumentándose la producción de IL-10 y TGF β . En cambio podría tener un efecto pro-inflamatorio debido a la activación de la producción de células Th17 [178].

Este efecto paradójico de SOCS3 en la regulación de las células T es debido a la doble función de STAT3, promoviendo a la vez la respuesta inflamatoria mediada por IL-17 y la anti-inflamatoria en la que participan la IL-10 y el TGF β .

1.6. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS: TERAPIA GÉNICA

En los últimos años ha existido un estancamiento en la aparición de nuevas terapias eficaces para combatir enfermedades alérgicas. Es el caso del asma, que a pesar del incuestionable progreso alcanzado en lo que se refiere al mecanismo de la enfermedad y el establecimiento de fenotipos subyacentes, el tratamiento actual sigue consistiendo en el uso de anti-inflamatorios sistémicos y poco específicos como los glucocorticoides en combinación con broncodilatadores y antihistamínicos. Estos fármacos controlan eficazmente los síntomas en la mayoría de los pacientes pero no curan la enfermedad, lo que ha hecho necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, entre las que se incluyen la inmunoterapia, en la que repetidas exposiciones al alérgeno induce tolerancia inmunológica, o el uso de inhibidores específicos o anticuerpos frente a mediadores del proceso alérgico como la IgE y varias citocinas como la IL-5 y la IL-13.

A pesar de los avances, un gran número de pacientes sigue sin responder a estas terapias lo que hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

La terapia génica se presenta como una alternativa dirigida hacia un paso concreto de los muchos que intervienen en el desarrollo de las enfermedades, y cuyo efecto es potencialmente local y duradero, gracias a la eliminación directa de uno o varios de los causantes de la enfermedad mediante transferencia génica, silenciamiento génico a través de herramientas como las enzimas de ADN, el ARN de interferencia o los oligonucleótidos antisentido. El bloqueo de una función biológica a través de la represión de la actividad transcripcional es más eficiente que la inhibición de una determinada proteína, puesto que a partir de una sola molécula de ARNm se generan múltiples copias de una proteína específica

1.6.1. SILENCIAMIENTO GÉNICO

El silenciamiento génico es un mecanismo que reduce y regula la concentración de ARNm dentro de la célula y por lo tanto, la formación de una proteína. El descubrimiento del ARN de interferencia (ARNi) supuso un avance en el conocimiento de la regulación génica. Controla procesos vitales como el crecimiento celular, la diferenciación de tejidos, la formación de heterocromatina y la proliferación celular.

Inicialmente se descubrió en forma de micro ARN (ARNmi) en el genoma de *Caenorhabditis elegans* [179], en 1993. Seis años más tarde, Fire y cols. describieron la capacidad de un ARN de doble cadena de silenciar la expresión génica en el nematodo *C. elegans* [180].

En 2001, Tuschl y su equipo demostraron que pequeños ARN de interferencia (ARNsi) sintéticos poseían la misma capacidad de regular a la baja la expresión de un gen, reconociendo secuencias específicas del mismo [181].

A partir de ese momento, el sector biotecnológico ha realizado considerables esfuerzos para avanzar en la investigación y desarrollo de nuevas terapias con ARNi frente enfermedades causadas por la expresión o el aumento de la concentración de ciertas proteínas.

1.6.1.1. Biogénesis y mecanismo de acción del ARN de interferencia

Existen dos vías principales de interferencia de ARN descritas: la vía del ARN de silenciamiento, y la vía del micro ARN. Ambas, comparten un mismo modo de acción, donde un complejo ribonucleoproteico formado por un miembro de la familia argonauta, se une a una secuencia de ARN de unos 20 a 30 nucleótidos y mediante complementariedad de bases reconoce un determinado ARNm diana que silencia mediante degradación o represión transcripcional (Figura 10).

A) ARNsi

El ARNsi es una de las vías fundamentales en células eucariotas, en la que un ARNsi específico de una secuencia es capaz de degradar un ARNm complementario diana [182] (Figura 10). La vía comienza cuando en el citoplasma se detectan grandes moléculas de ARN de doble cadena de tamaño superior a 30 nucleótidos, que activan la enzima Dicer. Esta endorribonucleasa, con

INTRODUCCIÓN

dominios helicasa y un dímero de ARNasa III interno, es capaz de cortar el ARN en pequeños fragmentos de 21 a 23 nucleótidos de longitud, conocidos como ARNsi. Este ARNsi posee, tras ser procesado por Dicer, modificaciones en sus extremos. En el extremo 3' sobresalen 2 nucleótidos, mientras que en el 5' aparece un grupo fosfato. En la práctica, el ARNsi puede ser producido sintéticamente y ser introducido en la célula, eludiendo el mecanismo de Dicer. A continuación el ARNsi se incorpora a un complejo proteico para formar el *pre-RNA-induced silencing complex* (RISC) con ayuda de las proteínas de unión a ARN de doble cadena. El complejo RISC incluye una proteína multifuncional, denominada argonauta 2 (ago 2), que pertenece a la familia de proteínas Argonautas. Ago 2 se une al ARNsi a través de sus dominios PAZ y MIID, y es la única de su familia que tiene capacidad de degradar el ARNsi de doble cadena para dar lugar a un ARNsi de cadena sencilla, gracias a su actividad ARNasa H.

Una vez que la hebra antisentido (pasajera) ha sido escindida y degradada, queda constituido el complejo RISC formado por ago 2 y la hebra sentido (guía) del ARN. El complejo RISC entonces lleva a cabo su función, uniéndose la hebra sentido al ARNm diana de forma complementaria, aunque dicha complementariedad no tiene que ser perfecta, tan sólo se necesita la unión de algunas bases. La actividad catalítica de ago 2 corta el ARNm, siendo degradado. El complejo RISC activo podrá destruir otras dianas de ARNm, y de este modo propagar el silenciamiento. Esta potencia añadida, asegura el efecto terapéutico durante un periodo comprendido entre tres y siete días en células de rápida división, y durante varias semanas en células sin división.

B) ARNmi

La génesis de los ARNmi tiene lugar en el núcleo (Figura 10). Comienza con la síntesis de un transcrito conocido como ARNmi primario (pri-ARNmi) de unos 1000 nucleótidos que contiene horquillas internas de doble cadena con extremos 5' y 3' de cadena sencilla sobresaliendo, y bucles de unos 10 nucleótidos [183].

El pri-ARNmi es troceado por el complejo microprocesador, formado por Drosha, una enzima de la familia de las ARNasas III y la proteína DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) que contiene dos dominios de unión a ARN de doble cadena [184]. DGCR8 reconoce las zonas de ARN de cadena sencilla del pri-ARNmi y ayuda a posicionar a Drosha que efectúa el corte endonucleolítico. El precursor resultante de unos 65 nucleótidos (pre-ARNmi) se asocia con la proteína exportina-5 y RanGTP, para ser exportado al citoplasma. Una vez en el citoplasma, la vía del ARNmi converge con la del ARNsi, explicada en el apartado anterior. En este caso, el complejo RISC puede estar formado por otras proteínas argonauta que pueden no tener actividad catalítica y, por tanto, el ARNm no será cortado en muchas ocasiones pero se inducirá represión traslacional antes ó después de la iniciación, seguida en muchas ocasiones por deadenilación y degradación.

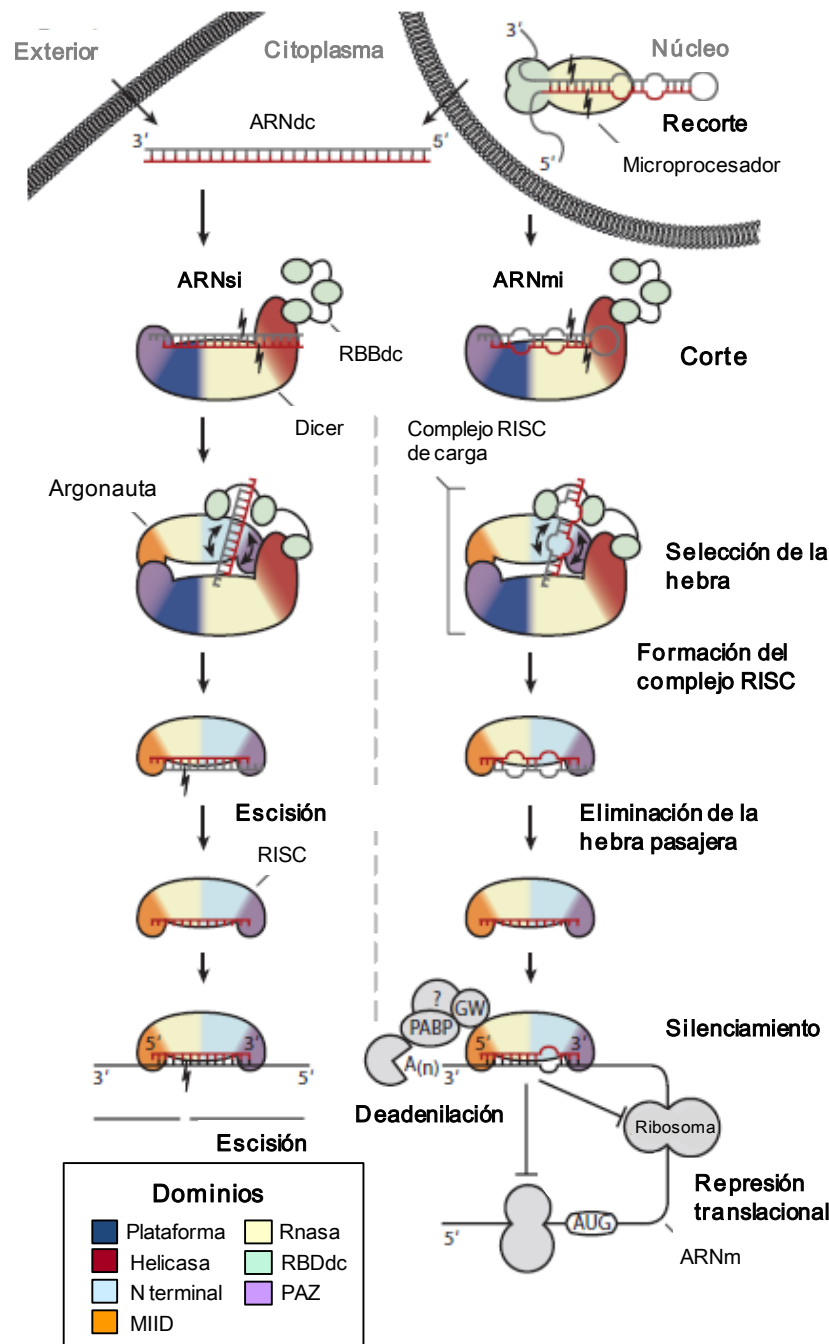


Figura 10. Vías de los ARN interferentes: ARNsi (izquierda) y ARNmi (derecha). La vía del ARNsi (izquierda) comienza con la escisión del ADN de doble cadena (ADNdc) exógeno o de origen nuclear por parte de Dicer. El ARNsi dúplex resultante se une a Argonauto gracias al complejo multiproteico de carga RISC, formado por Dicer, RBDdc y Argonauto. La cadena pasajera (gris) es cortada y eliminada. La cadena guía (rojo) permanece unida a Argonauto, constituyéndose el complejo RISC definitivo. En la vía del ARNmi (derecha) un transcrito de ARNmi primario es recortado por el complejo del microprocesador, que está formado por la endonucleasa Drosha unida a DGCR8. El pre-ARNmi resultante se exporta al citoplasma, donde se corta y carga en el complejo RISC como ocurría con el ARNsi. La eliminación de la cadena pasajera (gris) da lugar a que la cadena guía (rojo) dirija el silenciamiento como parte del complejo RISC maduro. En los casos en los que Argonauto sea catalíticamente inactivo o la complementariedad con el ARNm diana sea parcial, el silenciamiento puede darse por represión de la iniciación de la transducción o deadenilación seguida de degradación del ARNm. (Figura modificada de Wilson CR. 2013 Annu. Rev. Biophys. 42:217-239).

INTRODUCCIÓN

1.6.1.2. Terapias de silenciamiento génico con ARNsi.

En la actualidad, hay en marcha múltiples ensayos clínicos en lo que se están probando terapias con ARN de interferencia para tratar diferentes enfermedades.

En la tabla 4 se recogen algunos de los ensayos clínicos con ARN de silenciamiento que se están afrontando en la actualidad.

| Área clínica | Fármaco | Enfermedad | Diana | Compañía | Estado |
|---|----------------------|--|--|-------------------------------------|--------------|
| Enfermedades oculares y de la retina | TD101 | Paquioniquia congénita | Queratina 6A (mutante N171K) | Pachyonychia Congenita Project | Fase I |
| | QPI-1007 | Neuropatía óptica isquémica anterior no-arterítica | Caspasa 2 | Quark Pharm Inc. | Fase I |
| | AGN211745 | Degeneración macular asociada a la edad; neovascularización coroidal | VEGFR1 | Sirna Therapeutics Inc. | Fases I y II |
| | PF-655 | Edema macular diabético; degeneración macular asociada a la edad | RTP801 | Quark Pharm Inc. | Fase I |
| | SYL040012 | Glaucoma | Receptor $\beta 2$ adrenérgico | Sylentis | Fases I y II |
| | Bevasirib | Edema macular diabético | VEGF | Opko Health Inc. | Fase II |
| | Bevasirinib | Degeneración macular | VEGF | Opko Health Inc. | Fase II |
| Cáncer | CEQ508 | Poliposis adenomatosa familiar | B-Catenina | MDRNA Inc. | Fase I |
| | ALN-PLK1 | Tumores hígado | PLK1 | Alnylam Pharm. | Fase I |
| | FANG | Tumores sólidos | Furin | Gradalis Inc. | Fase I |
| | CALAA-01 | Tumores sólidos | RRM2 | Calando Pharm. | Fase I |
| | SPC2996 | Leucemia crónica mieloide | BCL-2 | Santaris Pharm. | Fase II |
| | ALN-VSP02 | Tumores sólidos | VEGF, kinesina | Alnylam Pharm. | Fase I |
| | NCT00672542 | Melanoma metastásico | LMP2, LMP7, MECL1 | Universidad Duke | Fase I |
| | Atu027 | Malignidades metastásicas sólidas y recurrentes | PKN3 | Silence therapeutics | Fase I |
| Enfermedades renales | QPI-1002/I5NP | Daño agudo renal | p53 | Quark Pharm Inc. | Fase I |
| | QPI-1002/I5NP | Función retardada en trasplante renal | p53 | Quark Pharm Inc. | Fases I y II |
| | QPI-1002/I5NP | Fallo renal agudo | p53 | Quark Pharm Inc. | Fase I |
| Reducción de LDLs | TKM-ApoB | Hipercolesterolemia | APOB | Tekmira Pharm Corp. | Fase I |
| | PRO-040,201 | Hipercolesterolemia | APOB | Tekmira Pharm Corp. | Fase I |
| Antivirales | SPC3649 | Virus hepatitis C | miR-122 | Santaris Pharm. | Fase II |
| | pHIV7-shI-TAR-CCR5RZ | VIH | Proteína Tat del VIH, ARN TAR del VIH, CCR5 humano | City of Hope Medical center/benitec | Fase 0 |
| | ALN-RSV01 | VRS en voluntarios | Nucleocápside de VRS | Alnylam Pharm. | Fase II |
| | ALN-RSV01 | VRS en pacientes con trasplante de pulmón | Nucleocápside de VRS | Alnylam Pharm. | Fase II |

Tabla 4. Ensayos clínicos con ARNⁱ* (clinicalTrials.gov). ApoB, apolipoproteína B, BCL-2, linfoma de células B 2; LMP2-7, proteína de membrana latente del virus Epstein-Barr 2-7; PKN3, proteína quinasa N3; PLK1, kinasa similar a polo 1; RRM2, motivo de reconocimiento de ARN 2; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial; VIH, virus de inmunodeficiencia adquirida; VRS, virus respiratorio sincitial.

Entre todos los tipos posibles de ácidos nucleicos que pueden funcionar como ARN interferente, el ARNsi es el candidato más estudiado para llevar a cabo terapias de silenciamiento génico. El ARNsi se une al complejo RISC en el citoplasma, mientras que, por ejemplo, en el caso de plásmidos de ADN que codifican para pequeñas secuencias en forma de horquilla de ARN (ARNsh), el ADN debe alcanzar el núcleo para realizar la transcripción.

Atravesar la membrana nuclear es un proceso muy ineficiente y por tanto la terapia no es tan efectiva, a pesar de que la potencia de silenciamiento del ARNsh es superior a la del ARNsi [185].

El diseño del ARNsi es fundamental, se debe tener en cuenta tanto la secuencia como la naturaleza química de su estructura (es decir, si se modificarán o no las bases y los azúcares que lo componen), la longitud total y la estructura de los extremos 5' y 3'. La síntesis química del ARNsi debe asegurar que la hebra cargada en el complejo RISC sea la correcta y sea procesada de igual manera que si se tratase de un ARNsi natural. Si esto no ocurre, pueden producirse los denominados efectos inespecíficos del silenciamiento, cuando restos del ARNsi mal procesado interactúan de forma complementaria con transcritos de otros genes distintos al gen diana de interés, provocando su degradación.

Además, se ha visto que ciertos motivos de las secuencias de los ARN de silenciamiento activan la producción de interferón a través de la activación de los receptores de tipo Toll (*Toll-like receptors*) [186]. La 2'-O-metil-modificación en los nucleósidos de purina de la hebra pasajera reduce esta inducción de interferón manteniendo la especificidad del proceso [187].

1.6.1.2.1. Administración pulmonar de ARNsi

Las tres rutas más empleadas para la administración de los ARNi terapéuticos en el pulmón son:

1. La ruta inhalada. Es la vía menos invasiva. Existen tres mecanismos disponibles en la actualidad para ejecutar la administración de un fármaco mediante inhalación: nebulizadores, inhaladores de dosis y los de polvo seco. A pesar de su uso rutinario en la clínica, no existe en la actualidad ningún estudio con ARNsi *in vivo* que utilice este método; en parte, debido a la dificultad que existe para diseñar estas moléculas, manteniendo su estabilidad y actividad biológica.
2. La ruta intratraqueal. Este modo de administración es muy utilizado en los estudios con modelos animales, a pesar de no ser fisiológico [188-190]. Requiere la realización de una traqueotomía para llevar a cabo la instilación de la solución en las vías respiratorias a través de un tubo conectado a una microjeringa.
3. La ruta intranasal. Esta ruta es menos invasiva que la anterior y actualmente se ha convertido en la vía de elección a la hora de afrontar una administración de un agente a los pulmones [191-197].

INTRODUCCIÓN

Existen importantes barreras en las vías respiratorias, como los cilios de las células epiteliales, el moco, el fluido alveolar o la presencia de macrófagos [198], que hay que tener en cuenta a la hora de administrar el ARNi como terapia en enfermedades pulmonares. Además de estos obstáculos extrínsecos, una vez alcanzada la superficie de la célula diana en el tracto respiratorio, el ARNi debe atravesar la membrana celular y acceder al citoplasma. Los ARN silentes son macromoléculas hidrofílicas con carga negativa, con un peso molecular aproximado de 13 kDa. Estas características hacen que el proceso de captación de ácidos nucleicos extracelulares más comúnmente utilizado por la célula sea el de la endocitosis [199].

La endocitosis es el proceso de internalización de macromoléculas y solutos mediante vesículas membranosas generadas a partir de invaginaciones de la membrana plasmática. Hasta la fecha se han descrito cinco vías endocíticas:

- A. Endocitosis mediada por clatrina.
- B. Endocitosis mediada por caveolas.
- C. Macropinocitosis.
- D. Fagocitosis.
- E. Endocitosis mediada por receptores.

De todas ellas, la mejor caracterizada es la endocitosis mediada por clatrina, siendo un proceso constitutivo en todas las células de mamíferos. El ligando se une primero específicamente a un receptor de superficie, lo que da lugar a un agrupamiento de complejos ligando-receptor recubiertos de moléculas de clatrina, que se invaginan y se separan de la membrana plasmática ayudados por la dinamina, para formar las denominadas “vesículas recubiertas de clatrina”. A continuación, el recubrimiento de clatrina se despolimeriza, generándose el endosoma temprano. A partir de este momento continua el proceso endocítico variándose el pH para progresar desde los endosomas tardíos hasta convertirse en lisosomas.

Para ayudar a la entrada del ARNsi en la célula y evitar la degradación, en muchas ocasiones se administra con ayuda de un vector. La mayoría de las aproximaciones llevadas a cabo tratan de evitar el uso de vectores virales debido a razones de seguridad. Un vector ideal para la administración de ARNsi debería cumplir los siguientes criterios:

- A. Condensar el ARNsi hasta alcanzar el tamaño de una nanopartícula.
- B. Proteger el ARNsi de la degradación enzimática.
- C. Facilitar su captación por parte de la célula diana.
- D. Ayudar a escapar de la vía endosomal.
- E. No ser tóxico.

Algunos de los vectores existentes hasta el momento son: los lipoplexos catiónicos y los liposomas, los lípidos polietilenglicolados, macromoléculas como el quitosan, el ácido glicólico poli-láctico (PLGA) y la polietilenimina (PEI) o los vectores peptídicos.

A pesar de todas estas opciones, algunos estudios han administrado el ARNsi en ausencia de vector, término que recibe el nombre de “ARNsi desnudo”, obteniendo resultados positivos. Al estar modificados químicamente son muy estables, pero aún se desconoce cómo el ARNsi puede llegar a la célula diana sin ser degradado, aunque, posiblemente la baja actividad nucleasa presente en las vías respiratorias, favorezca este proceso. Otra ventaja de la administración de los ARNsi en ausencia de vector es la baja inmunogenicidad de la terapia, evitándose la posible activación de mecanismos del sistema inmune innato que puedan llegar a generar respuestas de tipo Th1. Por último, los ARNsi desnudos son mucho más fáciles de producir al no tener que acoplarse a ningún vector, lo que además disminuye las posibilidades de degradación de la molécula al reducir los pasos de manipulación.

El uso del ARNsi desnudo ha dado lugar a varios ensayos clínicos como el del ALM-RSV01 que reduce eficazmente la infección por virus respiratorio sincitial (RSV) [200] (Tabla 4).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es analizar la función de SOCS3 en la enfermedad asmática para lo cual se han planteado y desarrollado los siguientes objetivos parciales:

1. Analizar la relevancia de SOCS3 en un modelo animal de asma crónica.
2. Estudiar el papel de SOCS3 en pacientes con enfermedades Th2, así como la implicación de los eosinófilos:
 - 2.1. Evaluación de la expresión de SOCS3 en eosinófilos de pacientes con asma y bronquitis eosinofílica-no asmática.
 - 2.2. Analizar la expresión de SOCS3 en pacientes con esofagitis eosinofílica.
 - 2.3. Estudiar la regulación de SOCS3 en los eosinófilos: Papel de las citocinas Th2 y de la PGE₂.
 - 2.4. Análizar de la función de SOCS3 en eosinófilos de pacientes asmáticos: silenciamiento génico de SOCS3.
3. Estudiar en un modelo *in vivo* si el silenciamiento de SOCS3 es una buena aproximación terapéutica para el tratamiento del asma alérgica.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MODELOS ANIMALES

Todos los procedimientos experimentales desarrollados con animales, se sometieron a los estándares internacionales de bienestar animal y fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz. Para llevar a cabo los modelos experimentales se utilizaron ratones machos de la cepa A/J (Harlan Ibérica, España) y cinco semanas de edad.

3.1.1. MODELO DE ASMA ALÉRGICA CRÓNICA 1: TRATAMIENTO CON GALECTINA-3

En el primer modelo de inducción de asma alérgica crónica se utilizaron un total de 60 ratones, de los que 50 se sometieron a un protocolo de sensibilización con ovoalbúmina (OVA grado V; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), que consiste en la instilación intranasal de 50 μ L de OVA (1mg/mL) en solución salina (Figura 11). Las instilaciones se llevan a cabo tras anestesiarse ligeramente al animal con isoflurano (Forane, Abbot, Chicago, IL, Estados Unidos).

Las instilaciones se realizaron 3 veces por semana durante un periodo total de 12 semanas. Los 10 ratones restantes, se usaron como controles negativos, administrándoles solución salina en lugar de OVA (grupo SS).

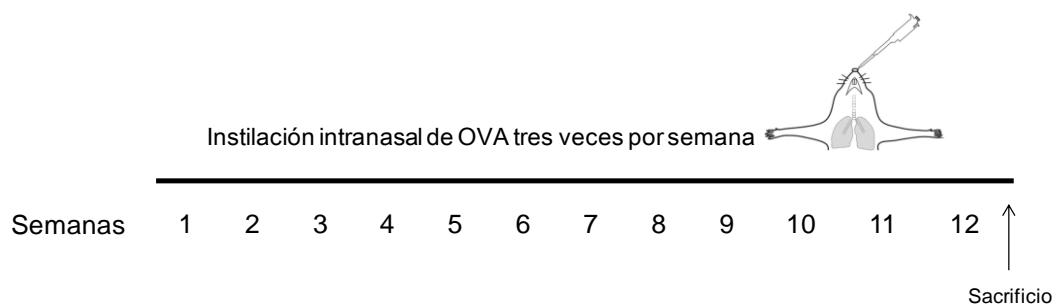


Figura 11. Protocolo de sensibilización de los ratones usando como antígeno ovoalbúmina.

A partir del día 14 del protocolo, los ratones sensibilizados a OVA se clasifican en tres grupos en función del tratamiento que reciben cada 15 días hasta la semana 10:

- Grupo control positivo (OVA, n=15): recibe instilación intranasal de 50 μ L de solución salina cada 15 días.
- Grupo OVA pEGFP (n=15): se le administra 50 μ L de plásmido vacío sin Galectina-3 (1mg/mL).
- Grupo OVA pEGFP-GAL-3 (n=20): se le instilan 50 μ L de plásmido con el gen de la Galectina-3, a una concentración de 1 mg/mL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Al final del protocolo, transcurridas las doce semanas, los animales se sacrifican recibiendo una sobredosis del anestésico inhalado, evitándose el sufrimiento de los ratones con este método eutanásico.

3.1.2. MODELO DE ASMA ALÉRGICA CRÓNICA 2: TERAPIA CON EL ARN^{si} DE SOCS3

Para llevar a cabo este segundo modelo de asma alérgica crónica se emplearon un total de 68 ratones, que se clasificaron en los siguientes cuatro grupos de experimentación:

- Grupo control negativo o solución salina (SS, n=17).
- Grupo sensibilizado a ovoalbúmina (OVA, n=16).
- Grupo sensibilizado a ovoalbúmina tratado con el control negativo de silenciamiento (OVA ARN^{si} C-, n=16).
- Grupo sensibilizado a ovoalbúmina tratado con el ARN de silenciamiento de SOCS3 (OVA ARN^{si} SOCS3, n=19).

Los ratones se sensibilizaron los días 0 y 14 mediante una inyección intraperitoneal que contenía 10 µg de ovoalbúmina (OVA grado V; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y 20 mg de hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) disueltos en tampón fosfato salino (PBS). A partir del día 27 comenzaba la inmunización; para ello los ratones eran previamente anestesiados ligeramente mediante isoflurano (Forane, Abbot, Chicago, IL, Estados Unidos). A continuación se instilaba OVA a una concentración de 1 mg/mL ó solución salina en el caso particular del grupo SS, manteniendo un volumen total de 15 µL. La figura 12 recoge el calendario detallado que se siguió para llevar a cabo el protocolo de inducción de asma crónica.

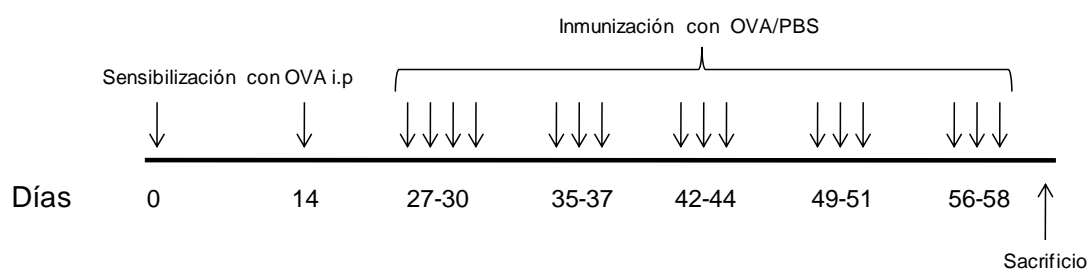


Figura 12. Protocolo experimental de inducción de asma crónica. Sensibilización intraperitoneal (i.p) con OVA en los días 0 y 14, seguida de repetidas inmunizaciones mediante instilación intranasal con OVA o PBS dependiendo el grupo de estudio.

El ARN^{si} de elección fue diseñado y sintetizado por Dharmacon (Chicago, IL, Estados Unidos). Se optó por la línea Accell, y se encargó la síntesis de una mezcla de cuatro dúplex de ARN^{si} pre-diseñados de ratón que reconocían diferentes regiones del ARN mensajero de SOCS3.

Las secuencias específicas de cada uno son:

#1: sentido 5'-GCCUCAAUACACUUUUUAUAAUU-3', antisentido 5'-PUUAUAAAAGUGAUUGAGGCUU-3'.

#2: sentido 5'-GUAUGAUGCUCCACUUUAAUU-3', antisentido 5'-PUUAAAGUGGAGCAUCAUACUU-3'.

#3: sentido 5'-CUGUUUUGAAUAAUGUUUAAUU-3', antisentido 5'-PUAAACAUAUUCAAAACAGUU-3'.

#4: sentido 5'-GGGGAAUCUCAAACUUUCUU-3', antisentido 5'-PGAAAGUUUGAAGAUUCCCCUU-3'.

El control negativo de silenciamiento es indispensable para evaluar los posibles efectos inespecíficos de la técnica. Se eligió un ARNsi dúplex diseñado por Dharmacon cuya secuencia no es complementaria a ningún ARN mensajero de ratón (sentido 5'-UGGUUUACAUGUCGACUAAU-3', antisentido 5'-PUUAGUCGACAUGUAAACCAUU-3').

Todos los ARNsi fueron disueltos en agua libre de nucleasas y se administraron un total de 10 dosis intranasales distribuidas en los días 24, 27, 30, 34, 38, 41, 45, 48, 52 y 55 del modelo. Para determinar la dosis efectiva, se probaron varias concentraciones en el modelo de inducción de asma crónica (de 2 a 20 μ M), estableciéndose como dosis terapéutica la concentración de 2 μ M.

3.2. SUJETOS DE ESTUDIO

Todos los individuos asmáticos que participaron en el estudio fueron seleccionados entre los pacientes que acudían al servicio de Alergología de la Fundación Jiménez Díaz en Madrid. En el reclutamiento de los sujetos con esofagitis eosinofílica participaron además del servicio de Alergología de la Fundación Jiménez Díaz, los servicios de la misma especialidad pertenecientes a los hospitales de La Paz y el Niño Jesús, ambos sitios en Madrid. Por último, los individuos sanos que han participado en el estudio, pertenecen al personal del servicio de Alergia e Inmunología del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD).

La obtención de muestras biológicas (bien de sangre periférica por venipuntura o biopsias esofágicas) se llevó a cabo siempre tras la confirmación de participación en el estudio y la firma del consentimiento informado por parte de todos los individuos. En dicho consentimiento se explica al paciente el proyecto que se intenta acometer y se indica su aprobación previa por parte del Comité Ético del IIS-FJD, de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

La selección de los sujetos de estudio estuvo restringida a una serie de criterios de inclusión que se detallan a continuación para cada grupo de individuos.

- **Individuos sanos.** Son individuos no fumadores, sin historial de asma ni enfermedades alérgicas y/o BENA.

- **Individuos con asma.** Todos los pacientes de este grupo fueron diagnosticados como asmáticos siguiendo los criterios establecidos según la *American Thoracic Society*.

Estos individuos mostraron una mejoría superior al 12% en el volumen espiratorio forzado durante los primeros 10 minutos tras la administración de terbutalina inhalada, teniendo una prueba de metacolina positiva (PC_{20} inferior a 16 mg/mL), lo que implica hiperreactividad de las vías aéreas. Dichos sujetos presentaban un grado medio de gravedad de la enfermedad y eran clínicamente estables. Se incluyeron tanto pacientes atópicos como no atópicos.

- **Individuos con BENA.** Son pacientes que referían tos aislada desde al menos 8 semanas, sin presentar síntomas que sugirieran obstrucción variable al flujo aéreo, con valores espirométricos normales, un valor de PC_{20} en la prueba de metacolina superior a 16 mg/mL, radiografía normal de tórax y eosinofilia en el esputo superior al 3%; cumpliendo así los criterios de diagnóstico de esta patología [201].
- **Individuos control (estudio EoE).** Se reclutaron pacientes del servicio de Gastroenterología procedentes de los tres hospitales que integraban el estudio (Fundación Jiménez Díaz, La Paz y el Niño Jesús). Estos individuos presentaban dolor abdominal y características clínicas compatibles con la enfermedad de reflujo gastroesofágico. Todos ellos eran pacientes sin diagnóstico previo de EoE, y en las biopsias del esófago se detectaron menos de 5 eosinófilos por campo de gran aumento (x400).
- **Individuos con EoE.** Se reclutaron pacientes que cumplían los criterios tanto clínicos como histopatológicos para ser diagnosticados de esta enfermedad [135]: síntomas clínicos de disfunción en el esófago y más de 15 eosinófilos por campo de gran aumento detectados en las biopsias esofágicas.

3.3. ENDOSCOPIAS Y OBTENCIÓN DE BIOPSIAS ESOFÁGICAS

Previa a la obtención de la biopsia, los pacientes permanecieron dos semanas sin tratamiento con corticosteroides. Se realizaron al menos dos biopsias de cada tracto del esófago: superior, medio e inferior. Una de las muestras obtenidas fue teñida con hematoxilina y eosina para el conteo de eosinófilos y el análisis histológico.

El conteo superior a 15 eosinófilos por campo (0,158 mm², x400) en las tres regiones supuso criterio de diagnóstico de EoE, junto con las manifestaciones clínicas y las manifestaciones endoscópicas.

La segunda biopsia se sumergió en TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y se almacenó a -80°C para realizar los análisis posteriores.

3.4. PURIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC) Y EOSINÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Tras la obtención de muestras de sangre periférica, en tubos con ácido etilendiamino tetracético EDTA (30 mL), se purificaron los eosinófilos y/o las células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC).

En un primer paso, las diferentes fracciones celulares fueron separadas por centrifugación diferencial en gradiente (Lymphoprep, Rafer, España). La fracción mononuclear obtenida, que corresponde a las denominadas PBMC, se lavó dos veces con solución salina y se sumergió en el reactivo TRizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), previo contaje en cámara de Neubauer.

Por otro lado, los glóbulos rojos de la fracción polimorfonuclear se lisaron con una solución de lisis (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5). La purificación de eosinófilos continuó con un segundo paso en el que se eliminaron, mediante selección inmunomagnética, las células residuales de la fracción polimorfonuclear con un cóctel de marcadores de superficie que incluía: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD123 y glicoforina A (EasySep, StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). Mediante esta técnica se consigue una selección negativa de los eosinófilos que no comparten ninguno de los marcadores anteriores.

Las células obtenidas, teñidas con un colorante para eosinófilos (0,05% azul de toluidina, 0,85% NaCl, etanol 95% y saponina), se contabilizaron y además se evaluó su viabilidad, en una cámara de Fuchs-Rosenthal. Para evaluar la pureza del proceso, los eosinófilos purificados se teñían con los anticuerpos, anti-CCR3 conjugado con isocianato fluoresceína (FITC) y anti-CD16 conjugado con ficoeritrina (PE), y se analizaban por el citómetro de flujo (FACS CANTO II). La pureza fue de rutina mayor del 95%.

3.5. CULTIVO DE EOSINÓFILOS

Los eosinófilos purificados de sangre periférica se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 completo (10% suero bovino fetal inactivado, 100 U/mL penicilina y 100 $\mu\text{g/L}$ estreptomicina, 5 mM piruvato sódico, 2 mM glutamina) de Lonza (Basilea, Suiza) a 37°C y 5% de CO_2 ; y se cultivaron con diferentes dosis de los siguientes estímulos: IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ (rango de dosis entre 0,1 y 20 ng/mL) todos ellos de R&D Systems (Minneapolis, MN, Estados Unidos), ó PGE_2 (rango de dosis entre 10^{-4} y 10^{-6} M) de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, Estados Unidos), con el fin de conocer cuál era la concentración óptima para cada uno de dichos estímulos. Los cultivos se recogieron a diferentes tiempos y las células se centrifugaron y se homogenizaron en TRizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para la posterior extracción de ARN. Para la extracción y posterior evaluación proteica, las células se lisaron en tampón de lisis 1.5X (10%

glicerol, 10% dodecil sulfato sódico (SDS), 20% β -mercaptoetanol, 0,05% azul de bromofenol y Tris 1 M, pH 6,8).

3.6. INMUNOCITOQUÍMICA DE EOSINÓFILOS

Los eosinófilos purificados de sangre de sujetos con asma, BENA o sanos, se dispusieron en portaobjetos mediante citocentrifugación y se trataron con metanol y peróxido de oxígeno (H_2O_2) en PBS para bloquear la peroxidasa endógena. A continuación se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 4% junto con suero de cabra al 6% (DAKO, Carpinteria, CA, Estados Unidos) y tras lavar, se añadió el anticuerpo de conejo anti-SOCS3 humano a una concentración de 60 μ g/mL (Sta. Cruz Bioechnologies, Dallas, TX, Estados Unidos) o IgG de conejo como control durante 30 minutos a temperatura ambiente. El revelado se realizó siguiendo las instrucciones del kit *LSAB and System HRP* (DAKO). Por último, los eosinófilos se tiñeron con hematoxilina durante 10 minutos para visualizar los núcleos.

3.7. INMUNOFLUORESCENCIA DE EOSINÓFILOS

Los eosinófilos purificados de sangre de sujetos sanos ó con asma se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos en agitación y se conservaron en una solución de PBS y cloruro amónico 50 mM, a 4°C hasta su marcaje.

Para el marcaje, las células se lavaron con PBS y se incubaron con la solución de bloqueo (1% PBS-BSA, 0,5% saponina) durante una hora. A continuación se lavó dos veces con la solución de permeabilización (glicina 0,1M, 0,5% saponina, HEPES 0,1M, 1% BSA) y se procedió a incubar las células con el anticuerpo primario (anti-SOCS3 humano de ratón, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Estados Unidos) durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se lavó con la solución de permeabilización y se incubó una nueva hora con el anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa 647nm (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Tras lavar las células con PBS y agua; se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI 300 nM, Molecular Probes, Life Technologies) durante 3 minutos para marcar los núcleos y, tras centrifugar, se incluyeron en una solución comercial para proteger la fluorescencia (Prolong, Molecular Probes, Life Technologies), dejándolas en oscuridad para preservar la fluorescencia, hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000S, Melville, NY, Estados Unidos), con ayuda del programa NIS-AR (Nikon). Posteriormente las imágenes fueron analizadas con el programa Image J.

3.8. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE ARN^{si} DE SOCS3 EN EOSINÓFILOS PURIFICADOS

Los ensayos de silenciamiento génico se realizaron siguiendo el protocolo previamente descrito por Goplen y cols. [202]. Los eosinófilos purificados se cultivan en medio RPMI libre de antibióticos, y

suplementado con 10% STFi, 10 ng/mL de GM-CSF y 10 ng/mL de IL-5 (R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos), a una concentración de 1×10^6 células/mL.

Al cultivo se añaden tres ARNsi (cada uno a una concentración final de 50 nM) con secuencias complementarias para diferentes regiones del ARNm de SOCS3 (Ambion Inc. Austin, TX, Estados Unidos), detalladas a continuación:

- s17190: sentido AGAAGAGCCUAAUACAUCUtt,
antisentido AGAUGUAAUAGGCUCUUCUgg.
- s17191: sentido GCACCUUUCUGAUCCGCAtt,
antisentido UCGCGGAUCAGAAAGGUCcg.
- s17189: sentido UGAUUUGGUUUAACCUGAtt,
antisentido UCAGGUUUAACCAAUAa.

Todos los ensayos se realizaron en paralelo con un control negativo de silenciamiento (Ambion Inc.) cuya secuencia no se complementaba con ningún ARNm de células humanas. Los cultivos incubaron durante 48 horas a 37°C y atmósfera al 5% de CO₂.

3.9. CITOMETRÍA DE FLUJO DE EOSINÓFILOS

Los eosinófilos purificados (1×10^5 células) se resuspendieron en una solución de PBS/STFi al 2%. A continuación se bloquearon las fracciones constantes (Fc), incubando los eosinófilos con una solución comercial durante 10 minutos (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch, Alemania) y se tiñeron con diferentes anticuerpos marcados con fluorocromos durante 20 minutos en hielo (anti-humano ICAM-1 PE, LFA-1 FITC, VCAM-1 FITC, VLA-4 PE, integrina- $\alpha 2$ FITC, CD16 PE o CCR3 FITC), todos ellos de Becton Dickinson (BD, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Por último, las células se lavaron 2 veces con PBS/STFi al 2% para eliminar el exceso de anticuerpo y se analizaron por citometría de flujo en el citómetro FACS CANTO II (BD).

3.10. ENSAYOS FUNCIONALES CON EOSINÓFILOS

3.10.1. MIGRACIÓN

Para evaluar la migración de los eosinófilos, se colocaron insertos para cultivo celular de un tamaño de poro de 5 μ m (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos) en placas de cultivo de 24 pocillos. En el fondo del pocillo se añadieron 600 μ l de medio RPMI sin rojo fenol (Lonza, Basilea, Suiza), sin ó con 10 ng/mL de IL-5 (R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos); mientras que en la parte superior de la membrana del inserto se añadieron $2,5 \times 10^5$ eosinófilos contenidos en un volumen final de 250 μ L. Las placas se incubaron durante 90 minutos a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo, las células migradas se recogieron de la parte inferior de la cámara y

MATERIALES Y MÉTODOS

se contaron por citometría de flujo durante 3 minutos en el citómetro FACS CANTO II (BD, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos).

3.10.2. ADHESIÓN

Los experimentos de adhesión se iniciaron con el recubrimiento de placas de 96 pocillos con 60 μ L de una solución de fibronectina (R&D Systems, 20 μ g/mL en PBS) a 4°C durante una noche. A continuación, se bloquearon los sitios libres con BSA al 0,1% para evitar posibles uniones inespecíficas. Los eosinófilos purificados de sangre periférica (tratados con ARNsi de SOCS3 o con el control negativo de silenciamiento) estimulados con IL-4, IL-5, IL-13 ó PGE₂ a las dosis y tiempos establecidos, se añadieron a la placa (7 x10⁴ células/pocillo) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Tras realizar lavados sucesivos con PBS para eliminar las células no-adherentes, se midió la actividad residual de la peroxidasa del eosinófilo (EPO) en las células adherentes; para ello se añadió a los pocillos el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) de BD Optiea (Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos), en presencia de H₂O₂ (1mM), que al ser degradado por la peroxidasa da lugar a un producto de color azul. La formación de este producto se mide a 630 nm en el lector Infinite F200 (Tecan, Männedorf, Suiza). Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.10.3. DEGRANULACIÓN

Los eosinófilos purificados de sangre periférica, tratados con ARNsi de SOCS3 ó el control negativo de silenciamiento, durante 48 horas, fueron estimulados con IL-4, IL-5, IL-13 ó PGE₂ a las dosis y tiempos establecidos. Transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se recogieron y tras centrifugarse, se resuspendieron en PBS, BSA 0,1%, HEPES 10 nM, Glucosa 10 nM, pH 7,4, a una concentración de 1x10⁶ células/mL. A continuación se añadieron 10 μ g/mL de citocalasina B y C5a a una concentración final de 300 nM, ambas de la casa comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, Estados Unidos), y se incubaron durante 20 minutos a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂. La citocalasina B inhibe la polimerización de actina, mientras que el C5a es una anafilotoxina que participa como componente del complemento y es el encargado de inducir la degranulación. El método de medida de EPO es idéntico al explicado en el apartado anterior (3.10.2).

3.11. ANÁLISIS DE LA INMUNIDAD HUMORAL

3.11.1. MODELO ANIMAL

3.11.1.2. Determinación de IgE total

La determinación de la IgE total en los sueros de los ratones se realizó mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) haciendo uso de un kit comercial (BD, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) y placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar E.I.A/R.I.A Plate 3590, Cambridge, MA, Estados Unidos).

El experimento se inició tapizando cada pocillo de la placa con 100 µl de una solución que contenía el anticuerpo de IgE de ratón, diluido en un tampón con carbonato sódico a pH 9,5. La placa se incubó a 4°C durante toda la noche, para a continuación ser lavada con PBS-Tween-20 al 0,05% (BioRad, Hércules, CA, Estados Unidos) y posteriormente bloquear los sitios de unión inespecíficos con una solución de PBS-10% de STFi. Tras lavar nuevamente cada pocillo, se añadieron los sueros de los ratones sin diluir, así como diluciones seriadas del estándar (IgE de ratón a una concentración inicial de 100 ng/mL) y se incubó toda la noche a 4°C.

Transcurrido el tiempo se llevaron a cabo sucesivos lavados y se añadió el anticuerpo de detección, anti-IgE biotinilado, junto con la enzima avidina-peroxidasa, que se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

Por último, se adicionó el sustrato TMB junto con el peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo con H₂SO₄ (2N) y se efectuó la lectura de absorbancia a 450 nm en un lector de placa automático (Infinite F200, Tecan, Männedorf, Suiza).

Después de construir la recta patrón con las concentraciones conocidas de la IgE estándar, se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos del suero de los ratones. Los resultados se expresaron como ng de IgE total/mL.

3.11.1.3. Determinación de IgE específica frente a OVA

La determinación de IgE específica frente a OVA en el suero de los ratones se llevó a cabo utilizando el mismo kit comercial descrito en el apartado anterior para cuantificar IgE total, realizando algunas modificaciones.

Esta vez, la placa de 96 pocillos se tapizó con una solución que contenía OVA a una concentración de 10 µg/mL disuelto en PBS y se incubó toda la noche a 4°C. Después de lavar y bloquear, se añadieron los sueros de los ratones sin diluir.

El resto del protocolo se siguió de la misma forma que se hizo para determinar la IgE total, excepto en el bloqueo y la incubación con el anticuerpo de detección; en este caso, la placa se mantuvo 2 horas a 37°C y la solución de bloqueo contenía, además de PBS y Tween-20 al 0,05%, BSA al 5%. Los resultados de absorbancia se expresaron como unidades de densidad óptica (D.O.).

3.11.1.4. Determinación de IgG₁ e IgG₂ específicas frente a OVA

Tanto la IgG₁ como la IgG₂ producida frente al antígeno OVA, se determinaron de igual forma que la IgE específica frente a OVA, como se ha descrito en el apartado anterior. Las únicas modificaciones radicaron en el empleo del anticuerpo de detección, siendo este un anticuerpo biotinilado anti-IgG₁ o anti-IgG₂, ambos de la casa comercial BD (Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos).

3.11.2. PACIENTES

El suero de los pacientes se obtuvo a partir de la sangre total extraída por venipuntura y centrifugada durante 10 minutos a 3000 rpm. La determinación de IgE total y específica frente a diferentes alérgenos para el estudio de la esofagitis eosinofílica, se realizó en el analizador de fluoroinmunoensayo ImunoCAP 250 (Thermofisher, Uppsala, Suecia). Se cuantificó la IgE específica frente alérgenos procedentes de las siguientes fuentes:

- **Aeroalérgenos (ALK-Abello, Madrid, España):** ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*), hongos (*Aspergillus spp*, *Alternaria alternata*), pelo y caspa de gato y perro, pólenes de árboles (*Cupressus sempervirens*, *Olea europaea*, *Platanus acerifolia*), pólenes de plantas (*Phleum pratense*) y de semillas (*Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*, y *Salsola kali*).
- **Alérgenos alimentarios:** harina, arroz, maíz, avena, clara de huevo, caseína de la leche de vaca, melocotón, manzana, melón, pollo, ternera, gamba, lentejas, garbanzos, guisantes, soja, calamar, gallo, merluza, atún, pez espada, cacahuete, nuez, ajo, patata y *Anisakis simplex*.

La cuantificación de la IgE específica para cada alérgeno se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Los resultados obtenidos se leyeron automáticamente en un analizador y los datos se almacenaron en la aplicación UDM (Thermofisher, Uppsala, Suecia) para su posterior análisis.

3.12. CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS EN SUERO Y SOBRENADANTES

3.12.1. ARRAY DE CITOCINAS

A partir de un *pool* de sueros de pacientes con EoE y otro de sujetos control, se llevó a cabo la detección del siguiente panel de citocinas humanas: C5a, CD40 ligando, G-CSF, GM-CSF, CXCL1, CCL1, CD54, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-16, IL-17, IL-17E, IL-23, IL-27, IL-32 α , CXCL10, CXCL11, CCL2, MIF, CCL3, CCL4, serpin E1, RANTES, CXCL12, y TNF- α (*Kit human cytokine array panel*, R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos). Los anticuerpos de captura de cada uno de estos factores se encuentran embebidos por duplicado en una membrana de nitrocelulosa, formando pequeños círculos a lo largo del array. Sobre cada círculo de la membrana de nitrocelulosa, se añade una mezcla constituida por un *pool* de sueros procedentes, bien de pacientes con EoE o bien de sujetos control, y el anticuerpo de detección biotinilado correspondiente, y se incuba durante toda la noche a 4°C. Cualquier complejo citocina/anticuerpo de detección que se constituya durante el proceso de incubación se unirá al anticuerpo de captura específico de esa citocina y como consecuencia a la membrana del array. Por último se añaden la enzima estreptavidina-peroxidasa de rábano y los reactivos que catalizan la

reacción de quimioluminiscencia, para obtener finalmente un revelado de la señal proporcional a la cantidad de citocina unida.

3.12.2. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)

La cuantificación de IL-5 y VEGF-A en suero de pacientes con EoE y sujetos control también se realizaron mediante ELISA, siguiendo un protocolo idéntico al explicado en el apartado 3.11.1.2. para la cuantificación de la IgE en los sueros de los ratones, sólo que en este caso se utilizaron kits comerciales para la determinación de estos factores (IL-5 y VEGF) en humanos (BenderMedSystems, Viena, Austria).

3.13. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE DIVERSOS FACTORES Y CITOCINAS POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

3.13.1. EXTRACCIÓN DE ARN

3.13.1.1. Homogeneizado del tejido

Para extraer ARN de tejido, es necesario un paso previo de disgregación del mismo. Las muestras de tejido (pulmón de ratón o biopsia de esófago humana) se sumergieron en 1 mL de TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y con un homogeneizador (Tempest, Virtis, Warminster, PA, Estados Unidos) se procedió al disgregado y homogeneizado. Tras centrifugar la muestra, el material insoluble del sedimento compuesto por membranas celulares, polisacáridos y ADN de alto peso molecular, se descartó, y el sobrenadante se recogió para proceder a extraer ARN siguiendo el protocolo comercial del TRIzol (Life Technologies) que se detalla en el apartado siguiente.

3.13.1.2. Extracción de ARN

El homogeneizado en TRIzol, procedente de células de cultivo o de tejido, se incubó durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos y a continuación añadir el cloroformo (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, Estados Unidos).

Tras centrifugar, se visualizan las 3 fases: la fase fenol-cloroformo, la interfase y la fase superior acuosa donde se encuentra el ARN.

Se recogió por tanto, la fase acuosa y se precipitó el ARN con isopropanol durante 10 minutos. A continuación se realizó una centrifugación, eliminando el sobrenadante y el ARN precipitado se lavó con etanol al 75%. Por último, el sedimento se dejó secar para eliminar trazas de etanol y se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cantidad de ARN obtenida se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Bonsai Technologies Group, Madrid, España). La contaminación de las muestras, con impurezas orgánicas e inorgánicas y proteínas, afecta de forma significativa a la sensibilidad y especificidad del resultado, por lo que también se comprobó la pureza del ARN, determinada mediante la relación de absorbancia (A) 260/280 y A 260/230, que debía estar comprendida entre los valores de 1,8 y 2.

3.13.2. SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

Un microgramo de ARN se retrotranscribió a ADNc de acuerdo con las instrucciones del kit de transcripción reversa *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Warrington, Gran Bretaña). Se preparó una mezcla de reacción en un volumen total de 20 µL, que contenía la enzima transcriptasa reversa MultiScript, dextrosirribonucleótido fosfato (dNTP), *random primers*, todo ello disuelto en un tampón adecuado y a la mezcla se añadió el ARN disuelto en agua libre de nucleasas. La retrotranscripción se realizó en un termociclador (Applied Biosystems), con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C.

3.13.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

La PCR se realizó en el sistema de PCR a tiempo real 7500 (Applied Biosystems). Tanto la mezcla de reacción (*TaqMan Universal PCR Master Mix*), como las sondas *TaqMan* procedían de la casa comercial Applied Biosystems. Las sondas *TaqMan* utilizadas, específicas tanto de humano como de ratón, fueron: SOCS3, SOCS1, SOCS5, IL-13, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A, FOXP3, T-Bet, GATA-3, TGFβ, IFNγ, CCR3, eotaxina-3, MAPK1, β-actina y 18S.

Se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación (15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C).

La expresión génica del ARNm se analizó para cada muestra usando el valor de Ct (*cycle threshold*) obtenido de cada gen de interés. Dicho Ct fue relativizado con el Ct del endógeno, bien el ARNr 18s o la β-actina. Finalmente, la expresión génica relativa se calcula de la siguiente manera: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = DCt_{\text{gen}} - DCT_{\text{gen endógeno}}$ [203].

3.14. MICROARRAYS

La técnica de hibridación con microarrays permite analizar cambios en el perfil de expresión génica. Los microarrays son plataformas que contienen secuencias (oligonucleótidos) correspondientes a los diferentes genes existentes en un organismo y van a hibridar específicamente con el ADN complementario (ADNc) de cada gen (Figura 13).

Para estimar el nivel de expresión génica se debe partir del ARN total, constituido fundamentalmente por ARN mensajero, que se transforma mediante el proceso de transcripción inversa en una molécula más estable, el ADNc. El siguiente paso consiste en una transcripción *in vitro* del ADNc a ARN complementario (ARNc) que se biotinila y se fragmenta, antes de ser hibridado con el microarray.

Cada secuencia de ARNc hibridará con el oligonucleótido correspondiente a la secuencia de su gen únicamente en el pocillo o posición en el que se encuentre esta sonda específica. El revelado posterior mostrará el grado de hibridación que presenta cada gen.

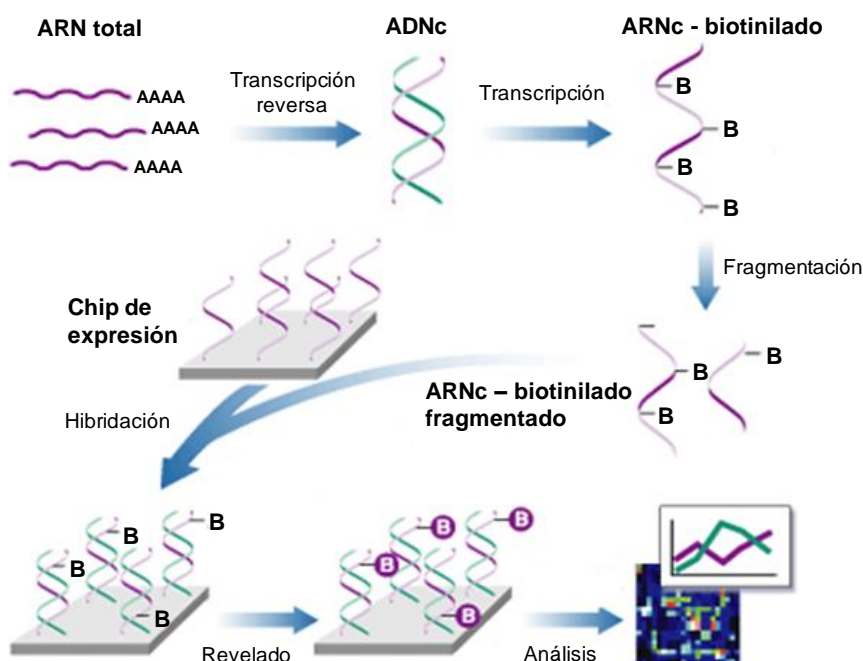


Figura 13. Esquema resumen de los pasos que comprenden el proceso de evaluación de perfiles génicos mediante la tecnología de los microarrays.

En el presente trabajo se han llevado a cabo dos estudios de expresión mediante la técnica de los microarrays, ambos llevados a cabo en el servicio de genómica de la Universidad Complutense de Madrid:

1. Evaluación de la expresión génica a partir del transcriptoma obtenido de los pulmones de ratones sensibilizados a OVA y ratones sensibilizados a OVA tratados con el plásmido que codifica para el gen de la galectina-3.

2. Determinación del perfil de expresión de micro ARN en pulmones de ratones sensibilizados a OVA y ratones sensibilizados a OVA que han recibido la terapia intranasal de silenciamiento del gen SOCS3

3.14.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE PULMÓN DE RATÓN E HIBRIDACIÓN EN LA PLATAFORMA DE MICROARRAY

La primera aproximación se realizó a partir del ARN total de los pulmones de los ratones incluidos en el primer modelo de asma crónica (apartado 3.1.1.). La purificación del ARN se acometió

mediante el protocolo del reactivo TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), según se detalla en el apartado 3.13.1. La plataforma utilizada para hibridar las muestras de ARN complementario (ARNc), una vez fragmentadas y biotiniladas, fue la *Mouse Genome 430 2.0 Miroarrays* (Affymetrix, Santa Clara, CA, Estados Unidos).

En el segundo estudio en el que se evalúa el perfil de expresión de micro ARN, se utilizó el kit *RNeasy Mini* (Quiagen, Hilden, Alemania) para purificar el ARN total de los pulmones de los ratones, en este caso procedentes del segundo modelo de asma crónica (3.1.2). El cambio de protocolo de extracción del ARN total se debe fundamentalmente a la necesidad de conservar íntegro el ARN total y este segundo kit es mucho más efectivo, evitándose la degradación de pequeños ARN como son ARNm. Para ello, las muestras inicialmente se lisaron y homogeneizaron en un tampón que contiene el agente desnaturizante tiocianato de guanidinio. A continuación, se añadió etanol, que proporciona las condiciones adecuadas para que el ARN se una selectivamente a una membrana insertada en una columna. Tras varios lavados mediante centrifugaciones para eliminar los productos contaminantes, el ARN se eluyó añadiendo agua libre de nucleasas a la membrana y procediendo a una última centrifugación. En este caso, la plataforma de elección para la hibridación del ARNc fue la *GeneChip miRNA 3.0 Array* (Affymetrix, Santa Clara, CA, Estados Unidos).

En ambos casos, la integridad y la cuantificación de cada ARN se evaluó en el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos). La pureza del ARN se determina mediante la relación A 260/280 y A260/230, que debe ser superior a 1,8 e inferior a 2. Por otro lado, la integridad revela el nivel de degradación del ARN, gracias al parámetro RIN (*RNA Integrity Number*), que es un algoritmo del software del Bioanalizador Agilent 2100, y debe ser siempre superior a 6. Tras evaluar la calidad del ARN purificado, un total de 5 µg de cada pulmón de ratón se utilizaron para llevar a cabo la técnica.

3.14.2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El Departamento de Bioinformática del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España) realizó el análisis de microarrays haciendo uso de la herramienta GEPAS versión 3.1 (<http://www.gepas.org/>)[204]. Posteriormente, el análisis funcional se llevó a cabo con *Babelomics suite* (<http://www.babelomics.org/>).

3.14.3. PROCESAMIENTO PREVIO

Los resultados obtenidos tras el proceso de normalización del microarray se sometieron a un pre-procesamiento antes de llevar a cabo el análisis. Se estandarizaron los datos utilizando el algoritmo RMA (*Robust Multichip Average*) [205].

A continuación se mezclaron múltiples sondas que reconocían un mismo gen. La media obtenida se representó como resumen de los valores de hibridación obtenidos.

3.14.4. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES

La expresión diferencial de genes se hizo con el paquete informático Limma de Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) [206]. Los valores de P se corrigieron utilizando la aproximación de la Tasa de Descubrimientos Falsos que disminuye la complejidad del análisis [207].

3.14.5. ANÁLISIS FUNCIONAL

El programa FatiScan es una variante del tradicional algoritmo de enriquecimiento de conjuntos de genes [203] capaz de detectar bloques significativos de genes relacionados funcionalmente y regulados a la alza o a la baja de una lista de genes ordenados por expresión diferencial [208]. Dicho método alternativo fue utilizado para detectar activaciones y desactivaciones de funciones biológicas o vías de señalización. FatiScan es parte del paquete informático de Babelomics que busca bloques de genes que están funcionalmente relacionados a través de diferentes criterios como ontología de genes o vías KEGG.

3.15. MEDIDA DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

3.15.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

3.15.1.1. Preparación del extracto de proteínas de pulmón y cuantificación

Para la preparación del extracto proteico se parte de un tercio del pulmón de cada uno de los ratones de los diferentes grupos, al que se le añade 1 mL de solución de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaP_2O_7 30mM, NaCl 40mM, EDTA 5mM pH 7,4, NP-40 1%, PMSF 1mM, Na_3VO_4 2mM, ácido deoxicólico 0,5%, leupeptina 10 $\mu\text{g/mL}$, aprotinina 5 $\mu\text{g/mL}$) y se tritura con el homogeneizador (Virtis, Tempest, Oakland, CA, Estados Unidos) dos veces durante 15 segundos a 30.000 rpm. A continuación se centrifuga a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante.

La cantidad total de proteína se cuantificó mediante el método colorimétrico BCA (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). La curva patrón se realizó utilizando diluciones seriadas 1/2 de BSA y se mide la absorbancia a 570 nm en el lector de placas Infinite F200 (Tecan).

Finalmente, se interpolan en la curva patrón los datos de absorbancia de las muestras para obtener la concentración proteica.

3.15.1.2. Extracción de proteínas a partir de biopsias de esófago

La extracción de proteínas a partir de biopsias de esófago sumergidas en TRIzol se realizó siguiendo el protocolo que indica la casa comercial (Life Technologies). Tras disgregar el tejido con el homogeneizador (Virtis, Tempest, Oakland, CA, Estados Unidos) dos veces durante 15 segundos a 30.000 rpm, se añadió el cloroformo y al centrifugar de nuevo se descartó la fase acuosa en la que se encuentra principalmente el ARN. A continuación, se precipitó el contenido proteico con isopropanol y tras centrifugar se lavó varias veces el precipitado resultante con una solución de

MATERIALES Y MÉTODOS

clorhidrato de guanidina (CH_6ClN_3 , 0,3 M) en etanol al 95% para eliminar los posibles restos de ADN.

El precipitado resultante se disolvió finalmente en SDS al 1%. La cantidad de proteína se cuantificó por el método BCA según se detalla en el apartado anterior.

3.15.2. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Antes de comenzar la separación electroforética, las muestras se mezclaron con un tampón de carga (Tris-HCL 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul bromofenol 0,2% y glicerol 20%) y se incubaron 5 minutos a 95°C para conseguir su completa desnaturalización.

Para la detección de proteínas, se cargaron 30 μL de la muestra en un gel al 10% de acrilamida y se desarrolló la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizante (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, utilizando el sistema de transferencia en medio semi-seco (*Trans-Blot Turbo Transfer System*, BioRad, Hércules, CA, Estados Unidos). Seguidamente, las membranas se bloquearon con gelatina al 0,25% disuelta en NET 1X (Tris-HCl 0,05 M pH 7,5, NaCl 0,15 M, 0,005% Tritón, pH 7,5) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las membranas se incubaron con diferentes anticuerpos primarios y, tras sucesivos lavados con NET 1X para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, se incubaron con sus respectivos los anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP). En la tabla 5 se detallan las condiciones experimentales de las diferentes inmunodetecciones.

Tras realizar nuevos lavados con NET 1X durante 1 hora, las inmunodetecciones de las proteínas se realizaron por quimioluminiscencia mediante el uso del reactivo ECL (GE Healthcare, Amersham, Gran Bretaña).

Las bandas de detección obtenidas fueron densitometradas con el programa Quantity One (BioRad).

| Anticuerpo primario | Dilución | Temperatura / Tiempo | Casa comercial | Anticuerpo secundario | Dilución | Casa comercial |
|-----------------------------------|----------|----------------------|--|--------------------------|----------|---|
| Anti-SOCS3 de ratón | 1:300 | 4°C / toda la noche | Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) | Anti-ratón de cabra HRP | 1:1000 | Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos) |
| Anti-SOCS3 de conejo | 1:800 | 4°C / toda la noche | Cell signaling Technology (Beverly, MA, Estados Unidos) | Anti-conejo de cabra HRP | 1:10000 | Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos) |
| Anti-ROCK2 de conejo | 1:800 | 4°C / toda la noche | Sta.Cruz Biotechnology (Dallas, TX, Estados Unidos) | Anti-conejo de cabra HRP | 1:10000 | Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos) |
| Anti-RhoA de ratón | 1:500 | 4°C / toda la noche | Cytoskeleton (Denver, CO, Estados Unidos) | Anti-ratón de cabra HRP | 1:1000 | Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos) |
| Anti- STAT3 fosforilado de conejo | 1:800 | 4°C / toda la noche | Cell signaling Technology (Beverly, MA, Estados Unidos) | Anti-conejo de cabra HRP | 1:10000 | Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos) |
| Anti-STAT3 de conejo | 1:1000 | TA / 2 horas | Cell signaling Technology (Beverly, MA, Estados Unidos) | Anti-conejo de cabra HRP | 1:10000 | Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos) |
| Anti- ERK fosforilado de conejo | 1:1000 | 4°C / toda la noche | Cell signaling Technology (Beverly, MA, Estados Unidos) | Anti-conejo de cabra HRP | 1:10000 | Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos) |
| Anti-ERK de conejo | 1:2000 | TA / 1 hora | Cell signaling Technology (Beverly, MA, Estados Unidos) | Anti-conejo de cabra HRP | 1:10000 | Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos) |
| Anti-βactina de conejo | 1:2000 | 4°C / toda la noche | Cell signaling Technology (Beverly, MA, Estados Unidos) | Anti-conejo de cabra HRP | 1:10000 | Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos) |

Tabla 5. Condiciones experimentales de las inmunodetecciones. HRP, peroxidasa del rábano; TA, temperatura ambiente.

3.16. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

3.16.1. INCLUSIÓN DE MUESTRAS

El estudio a nivel histológico se realizó a partir de un lóbulo derecho del pulmón de cada ratón incluido en los diferentes grupos experimentales de los dos modelos animales (modelo de terapia con galectina-3 o silenciamiento de SOCS3). Los lóbulos se fijaron en formaldehído al 4%, durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, el tejido pulmonar de los ratones se deshidrató en soluciones de etanol de graduación creciente (70°, 96° y 100°) y tras sumergirlos en xileno, se incluyeron en parafina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parte del proceso se llevó a cabo con la ayuda del procesador de tejidos automático Leica TP 1020 (Leica Microsystems GmbH, Weztlar, Alemania).

Las secciones de biopsias humanas de esófago proximal embebidas en parafina se prepararon en el servicio de anatomía patológica del Hospital de La Paz de Madrid.

A partir de los bloques resultantes para cada tipo de tejido (pulmonar o esofágico), se cortaron secciones de 5 µm de grosor con ayuda del microtomo (Leica, Weztlar, Alemania).

Seguidamente los cortes se desparafinaron durante dos horas a 60°C e hidrataron sumergiéndolos durante cinco minutos en las siguientes soluciones: xileno, etanol absoluto, etanol de 90° y etanol de 70°. Por último, se lavó en agua destilada 10 minutos.

3.16.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes desparafinados e hidratados se sometieron a un proceso de recuperación antigénica a pH 7 (PT LINK, Dako, Glostrup, Dinamarca) y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con agua oxigenada durante 30 minutos. A continuación se incubaron con los siguientes anticuerpos durante toda la noche a 4°C:

- Cortes de pulmón de ratones del modelo de asma tratado con galectina-3: anti-SOCS3 de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Estados Unidos).
- Cortes de esófago proximal humanos procedentes de pacientes con EoE o sujetos control: anti-ERK2 fosforilado de conejo (Santa Cruz Biotechnology) ó anti-IL-13 de ratón (eBiosciences, San Diego, CA, Estados Unidos).

Como anticuerpos secundarios se utilizaron un anti-conejo HRP sistema EnVision (Dako, Glostrup, Dinamarca), o anti-ratón HRP (eBiosciences). La distribución de la peroxidasa se visualizó con diaminobencidina. Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y montaron con medio DPX (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, Estados Unidos).

3.16.3. TINCIÓN HEMATOXILINA/EOSINA

La tinción de hematoxilina/eosina sirve para evaluar el infiltrado celular inflamatorio pulmonar. La hematoxilina, es un colorante de color azul/púrpura que tiñe los ácidos nucleicos de la cromatina celular. Los cortes hidratados se sumergieron en hematoxilina (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, Estados Unidos). Tras realizar un lavado de 10 minutos con agua destilada, se contrastó con eosina alcohólica al 1% (Sigma Aldrich) y se volvió a lavar con agua.

Una vez finalizada la tinción, se procedió a deshidratar las muestras histológicas siguiendo el siguiente orden: etanol de 70°, etanol de 90°, etanol absoluto y xilol. Finalmente las muestras teñidas se montaron con medio de montaje DPX (Sigma Aldrich) y se escanearon en el *iScan coreo* (Roche, Basilea, Suiza)

3.16.4. TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

La tinción Tricrómica de Masson se utilizó para realizar el análisis cualitativo del engrosamiento subepitelial siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial (Labolan, Navarra, España). Tras la hidratación de los cortes de tejido pulmonar, se añadió una solución de hematoxilina de Weigert's conteniendo además cloruro férrico (FeCl_3) y ácido clorhídrico (HCl), y se dejó actuar. Los portaobjetos se escurrieron y, sin lavar, se cubrieron de nuevo con una solución de ácido pícrico ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$), de este modo sólo se tiñeron los núcleos. A continuación, se lavaron en agua destilada y se tiñeron los citoplasmas con una solución de fucsina ácida ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_9\text{S}_3$) con rojo Ponceau (Sigma Aldrich). Se volvió a lavar con agua y se añadió el ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \times \text{H}_2\text{O}$), dejando que actuase para decolorar las fibras de colágeno y teñir los glóbulos rojos y el citoplasma.

Por último, se añadió la solución verde luz de Gurr's que tiñe colágeno. Se lavó ligeramente para eliminar el exceso de colorante con agua destilada, y se deshidrataron los tejidos por inmersión en alcoholes, para proceder a montar y escanear los portaobjetos.

Mediante esta técnica el tejido conjuntivo se tiñe de verde-azulado, las fibras musculares de rosa, los citoplasmas de color anaranjado y los núcleos de color marrón.

3.16.5. TINCIÓN ALCIAN BLUE/PAS

La tinción Alcian Blue/PAS, se utilizó para analizar la hiperplasia de las células mucosas, respetando el protocolo establecido por la casa comercial (Labolan, Navarra, España).

A los cortes de pulmón hidratados se les añadió la solución de Alcian Blue, pH 2,5. Sin lavar, sólo escurriendo el exceso de reactivo, se incubaron con una solución de tetraborato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$). A continuación, se lavaron con agua y se sumergieron en una solución de ácido periódico (H_5IO_6). Tras lavar de nuevo se incubaron con el reactivo de Schiff. Después se hizo un nuevo lavado y se incubó con una solución de metabisulfito de potasio ($\text{K}_2\text{O}_5\text{S}_2$), y posteriormente se añadió la solución fijadora. Se realizó un último lavado antes de añadir la solución de Mayer's Hemalum. Por último se deshidrataron los tejidos y se montaron en medio no acuoso (DPX, Sigma Aldrich).

Con esta técnica, las sustancias PAS positivas se tiñen de un rojo magenta, los mucopolisacáridos ácidos de azul turquesa y las mucinas de epitelio y cartílago pueden variar su tonalidad desde morado hasta azul oscuro.

3.17. LOCALIZACIÓN Y DETECCIÓN DEL ARNsi TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL

El primer paso antes de acometer el modelo, era comprobar si la vía de administración elegida, así como el vehículo en el que introducir la terapia (en este trabajo el ARNsi se introduce "desnudo", es decir sin usar ningún vehículo) eran adecuados y alcanzaba el tejido diana, en este caso, el pulmón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Por ello, se instiló en tres ratones un control positivo de ARNsi de la línea Accell específico para el gen de la ciclofilina B (Dharmacon, Chicago, IL, Estados Unidos) o bien sólo agua libre de ARNsas a otros tres ratones que actuaron como controles. Los ratones, a las 24 y 48 horas de ser instilados, se sacrificaron y los pulmones fueron extraídos para ser congelados a -80°C en OCT (Dako, Glostrup, Dinamarca). Por último, se llevaron a cabo cortes seriados en el criostato (Leyca, Wetzlar, Alemania) y se analizaron en el microscopio confocal (Leyca Microsystems, Wetzlar, Alemania) a una onda de excitación de 547 nm.

3.18. DETERMINACIÓN DE LA HIPERRESPUESTA BRONQUIAL A METACOLINA

La evaluación de la hiperrespuesta bronquial se realizó en el laboratorio del Dr. Jose Manuel Zubeldia en el Hospital Gregorio Marañón de Madrid. La pletismografía corporal total (Buxco Electronics, Troy, NY, Estados Unidos) es un sistema que analiza la función pulmonar del animal sin necesidad de ser previamente inmovilizado ni entubado.

Mediante un nebulizador ultrasónico, estableciendo un flujo constante de 1 litro/minuto, se procede a la aerosolización de cantidades crecientes de metacolina de forma simultánea en cuatro cámaras independientes (desde 3 mg/mL a 24 mg/mL durante dos minutos de tiempo).

Los cambios de presión en la vía respiratoria registrados por un neumotacógrafo durante los tres minutos siguientes a la administración de cada dosis, van a reflejar el grado de obstrucción de la misma.

El parámetro que cuantifica dicha obstrucción se denomina “Penh”. Este se obtiene de forma automatizada, mediante la siguiente relación:

$$\text{Penh} = (\text{Te}/\text{Tr}-1) \times \text{PEF}/\text{PIF}$$

Te/Tr-1: pausa

PEF: pico del flujo espiratorio

Te: tiempo espiratorio

PIF: pico del flujo inspiratorio

Tr: tiempo de relajación

Inicialmente se realiza una pletismografía basal y una inhalando PBS para recabar los parámetros basales. La medida de obstrucción de la vía aérea, se refleja como la relación entre el “Penh” correspondiente a cada dosis de metacolina inhalada, respecto al “Penh” obtenido en cada ratón tras la inhalación del PBS.

3.19. EVALUACION *IN VIVO* DE LA INFLAMACIÓN PULMONAR POR TÉCNICAS DE IMAGEN

3.19.1. TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

Las imágenes *in vivo* de tomografía computarizada (TC) se realizaron en un sistema de imagen nanoPET/CT (Bioscan, Washington, DC, Estados Unidos) diseñado para animales pequeños sito en

el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) de Madrid, bajo la supervisión del Dr. Jesús Ruiz-Cabello. Este sistema de imagen está equipado con un micro foco que actúa como fuente de rayos X y un mecanismo de alta resolución que recoge la radiación a través de un panel de fotodiodos con una resolución de 1024 x 3596 píxeles.

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilacina (100 mg/10mg por kg de peso) y se posicionaron en una cama térmica (38,7°C). Los parámetros para realizar el escaneo fueron: 360 proyecciones/rotaciones, 55 kV, 145 μ A, y un detector del tamaño de píxel de 141 μ m. La adquisición y la posterior reconstrucción se llevaron a cabo utilizando el programa Nucline (Mediso, Budapest, Hungría). Los cambios de densidad pulmonar, medidos como Unidades Hounsfield (UH) y de volumen, se cuantificaron mediante el programa Osirix (Pixmeo, Berna, Suiza).

3.19.2. TOMOGRAFÍA MOLECULAR DE FLUORESCENCIA

La tomografía de fluorescencia molecular (TFM) es una técnica de imagen que permite obtener una distribución espacial en 3 dimensiones (3D) de la concentración de sondas fluorescentes en animales pequeños *in vivo* de forma no invasiva, es por tanto una técnica cuantitativa, en este caso en concreto, de inflamación pulmonar.

En el día 58 del segundo modelo de asma crónica alérgica (ver apartado 3.1.2.), cuatro horas después de realizar la última administración intranasal de OVA, se inyectó intravenosamente 2 nmoles del agente ProSense 680 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos) resuspendido en 150 μ L de solución salina a cuatro ratones de cada grupo de experimentación.

El reactivo ProSense 680 es una sonda fluorescente que se encuentra “apagada” y en presencia de proteasas como las catepsinas B, L y S, o la plasmina, se activa y emite fluorescencia a 700 nm. A continuación se les anestesió con isoflurano (Forane, Abbott Laboratorios, España) y se depiló la zona ventral y parte del lateral derecho para minimizar la interferencia que ocasiona el pelo con la señal fluorescente.

A las 20 horas de administrar el agente fluorescente se realizó un escáner de todos los ratones gracias al sistema de tomografía de fluorescencia TMF 1500 (Perkin Elmer), bajo la supervisión del Dr. Jesús-Ruiz Cabello en el CNIC (Madrid). Para ello, los ratones se anestesiaron previamente mediante inyección intraperitoneal de ketamina y xilacina (100 μ L/10 g peso animal) y se colocaron cuidadosamente en la cámara de imagen del TFM.

Con el uso del software TrueQuant 3D, los resultados obtenidos se reconstruyeron y se definieron regiones de interés en el área pulmonar para obtener las cuantificaciones. Se aplicó el mismo umbral a todos los animales.

3.20. ANÁLISIS CELULAR DE LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES

3.20.1. OBTENCIÓN DE LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES

Veinticuatro horas después de la última administración intranasal del antígeno OVA, los ratones se anestesiaron por vía inhalatoria con isoflurano (Forane, Abbott Laboratorios, España), que es un anestésico que no afecta a la arquitectura pulmonar. Seguidamente, se introdujo una cánula en la tráquea y se lavaron los pulmones tres veces con 0,5 mL de suero salino, obteniendo un volumen final aproximado de 1 mL de suspensión celular.

3.20.2. CONTAJE DE LAS CÉLULAS TOTALES

El conteo de células totales del lavado broncoalveolar (LBA) se efectúa en una cámara de Neubauer. La muestra es diluida a la mitad en Azul Tripán para determinar la viabilidad celular. Así, las células muertas se tiñen de color azul, debido a que al estar alterada la permeabilidad de la membrana plasmática el colorante penetra en el citoplasma.

3.20.3. ANÁLISIS DEL PORCENTAJE DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El estudio del perfil celular del lavado broncoalveolar se analizó por citometría de flujo (FACS CANTO II, Becton Dickinson, BD, San José, CA, Estados Unidos), marcando las células con anticuerpos conjugados con un fluorocromo que nos permite detectar la expresión de marcadores de superficie específicos de cada población celular.

Los anticuerpos específicos utilizados, todos ellos de la casa comercial BD, fueron los siguientes:

- Eosinófilos: CD49d-PE (anti-VLA- α 4)
- Neutrófilos: CD32/16-FITC (Receptor Fc γ III/II)
- Macrófagos: CD14-APC
- Linfocitos T: CD3-FITC
- Linfocitos B: CD19-PE

A un total de 2×10^5 células del LBA, se les añadió 200 μ L de PBS junto con 2% de STFi (Lonza, Basilea, Suiza) y 3 μ L del anticuerpo 2.4G2 (BD), para bloquear los receptores Fc- γ . Las células, se incubaron 10 minutos en hielo y tras lavar con PBS/STFi al 2%, se procedió al marcaje con 3 μ L de los anticuerpos correspondientes, en función del subtipo celular a determinar y se volvieron a incubar, esta vez 20 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo, se lavó una vez más con PBS/STFi al 2% y, tras decantar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en 300 μ L de FACSTFlow (BD). Las muestras se evaluaron por citometría de flujo, analizándose un total de 5×10^4 por tubo.

3.21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las comparaciones estadísticas entre los grupos se llevaron a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis y U-test de Mann-Whitney para los datos no paramétricos, y el test de Fisher y ANOVA para los datos paramétricos. En algunos ensayos con eosinófilos en los que el tamaño de la muestra era menor y de carácter no paramétrico, se aplicó el test de Wilcoxon.

El grado de significación estadística aplicado es $P < 0,05$, es decir, se acepta como máximo una probabilidad de error no superior al 5%. Por lo tanto, se ha considerado que existen diferencias estadísticamente significativas a partir de una P menor igual a 0,05.

Los resultados se expresan como media \pm DE (desviación estándar). El análisis estadístico realizado en este estudio se ha llevado a cabo mediante el programa Graphpad InStat3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

RESULTADOS

4.1. AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE SOCS3 EN UN MODELO ANIMAL DE ASMA CRÓNICA: MODULACIÓN POR GALECTINA-3

El objetivo principal de la presente estudio comprende la búsqueda y caracterización de una nueva diana terapéutica para tratar la enfermedad asmática. Desde hace varios años, el entendimiento de los mecanismos que subyacen a las manifestaciones de dicha enfermedad y la investigación de posibles terapias, han sido objeto de estudio en nuestro laboratorio. En el año 2006, López y cols. [209] publicaban un artículo en el que gracias a la terapia intranasal con un plásmido de ADN codificante para el gen de la galectina-3, inhibidor principalmente la expresión de IL-5 [210], se conseguía una reversión de la inflamación, la hiperrespuesta de las vías respiratorias o el remodelo bronquial, en un modelo murino de asma alérgica crónica. Este modelo, ha sido la base para comenzar la búsqueda de nuevas moléculas implicadas en la enfermedad asmática a través del análisis del transcriptoma de los pulmones de los ratones asmáticos, y de los asmáticos tratados con dicha terapia génica.

4.1.1. VARIACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN RATONES SENSIBILIZADOS A OVA TRATADOS CON TERAPIA GÉNICA

La técnica de los microarrays fue empleada para llevar a cabo la búsqueda inicial de moléculas que potencialmente pudieran representar nuevas dianas en el tratamiento de la enfermedad asmática. Se analizó el perfil de expresión de 37.169 genes en pulmones procedentes de ratones con asma (n=6, grupo OVA) y ratones tratados con el plásmido codificante del gen de galectina-3 (n=8, grupo pEGFP-GAL-3) haciendo uso del test de FasScan. Mediante el análisis de las vías que se encontraban afectadas, se encontraron numerosos procesos biológicos regulados tanto a la alza como a la baja al comparar los dos grupos (Figura 14).

De todos los procesos afectados, cabe destacar la regulación negativa obtenida de numerosas respuestas relacionadas directamente con el sistema inmune y en particular con la orquestación de las respuestas de tipo 2, en la que se incluye la respuesta asmática, en los ratones tratados con la Gal-3, como son la producción de inmunoglobulinas, la señalización de las citocinas, la degranulación de los leucocitos o la activación de los linfocitos T ($P<0,05$).

En contraste, otros procesos biológicos se encontraron potenciados en los ratones tratados con la terapia génica con el plásmido de Gal-3 en comparación con los ratones sensibilizados a OVA sin recibir ningún tipo de tratamiento; entre las que se encuentran las vías implicadas en el desarrollo pulmonar y la diferenciación de las células musculares ($P<0,05$).

RESULTADOS

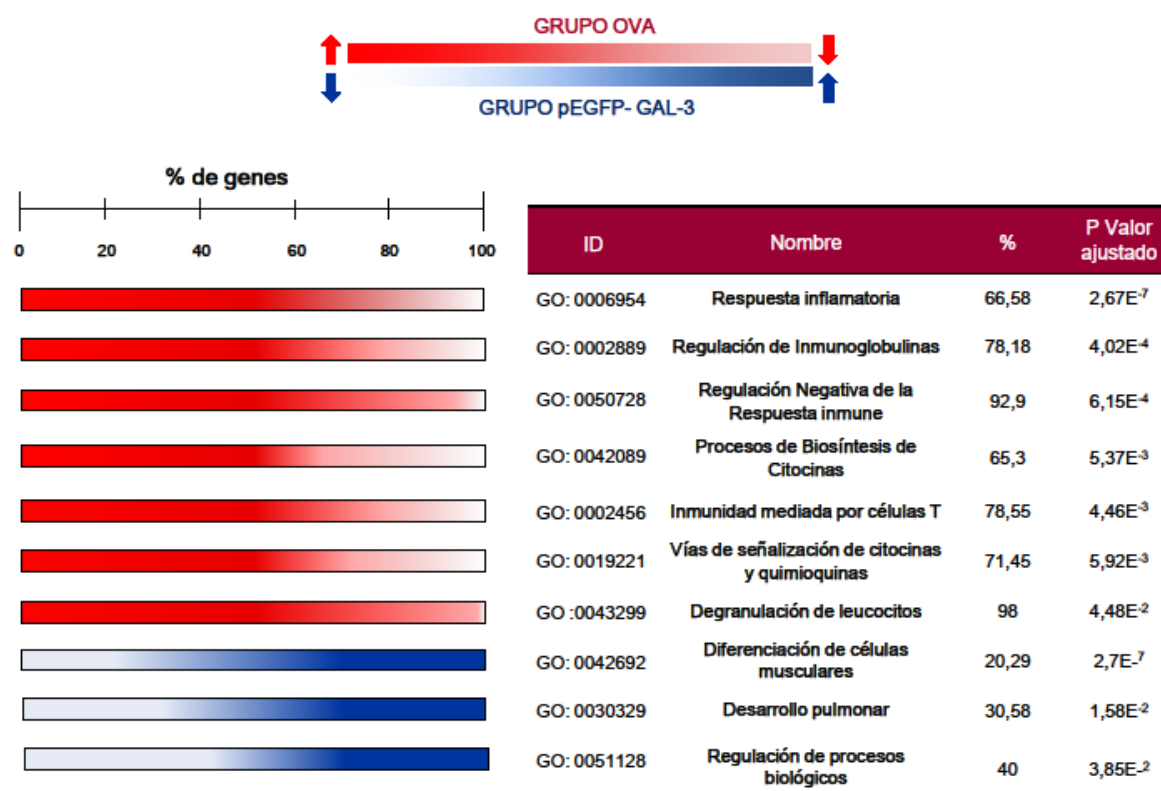


Figura 14. Procesos biológicos regulados a la alza o a la baja en el grupo OVA frente al grupo pEGFP-Gal-3. El color rojo indica las vías biológicas más representadas en el grupo OVA (porcentaje > 50) y el azul, aquéllas más presentes en el grupo pEGFP-Gal-3 (porcentaje < 50).

Posteriormente, el análisis de la función biológica identificó a los genes más representativos de las diferentes vías de señalización que se encontraban modificadas tras el tratamiento con el plásmido que codifica para el gen de la Gal-3. Entre los genes aumentados en los ratones asmáticos sensibilizados al antígeno OVA que disminuían su expresión debido a la terapia génica se encontraron algunos grupos de genes responsables de la supresión de la señalización de citocinas (SOCS1, SOCS3 y SOCS5), así como los genes de los intermediarios de las rutas de transducción de señales en las que dichos supresores participan (STAT1, STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6), o genes implicados en la expresión de fenotipos inmunes de carácter regulador (FOXP3, IL10, TGFB) (Tabla 6).

| Procesos biológicos | Genes |
|--|--|
| Respuesta inflamatoria | IDO1, IL17A, IL17B, IL17F, IL25, TGFB1, IL6, IL4, FOXP3, JAK2, STA5A, TLR4 |
| Regulación de la respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas | BCL6, FOXP3, FCG2B, IGH7, TNF, TGFB1, IL4, STAT6, IGH1A, IGH3, IGH7, C3, IL27RA |
| Regulación negativa de la respuesta inflamatoria | IL10, FOXP3, TGFB, SOCS3 , IL2, TNF1B, AD, FOXF1A, IL2RA, ZFP36 |
| Procesos de biosíntesis de citocinas | ADAM3, GATA3, IGF2BP1, IL12b, AP2K3, IL6, FOXP3, IL10, NFKB1, BCL3, IFNG, IL1B, TNF, WNT5A, IL21, IL1A, STAT5, IL17F |
| Inmunidad mediada por células T | IL4RA, BCL6, TGFB, IL20RB, IL2RA, IDO, FOXP3, CD27, CD74, LAG3, CASP3 |
| Vías de señalización mediadas por citocinas y quimiocinas | ILR1, IL23R, IL2RB, IL3, IL5, JAK1, JAK3, SOCS1, SOCS3 , SOCS5, STAT1, STAT3, STAT5A, STAT5B, IL6, IL6RA, TNF |
| Degranulación de leucocitos | PAK2A, RAB27A, IGH7, HMOX1, FOXF1A, FCER1G, PRAM1 |

Tabla 6. Genes que participan en diversos procesos biológicos reguladas a la alza en los ratones OVA en comparación con los tratados con el plásmido de galectina-3.

De todos los genes alterados en la respuesta asmática que modificaron su expresión debido a la terapia génica con Gal-3, se elige al grupo de genes que forman parte de la familia de supresores de la señalización de citocinas (SOCS) para investigar su papel en la enfermedad asmática. En particular, el estudio se centrará en SOCS3 puesto que su aumento en linfocitos T ha sido previamente relacionado con la gravedad del asma [156], debido a su importancia en el mantenimiento de la inflamación, una de las características fundamentales de la enfermedad.

4.1.2. COMPROBACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SOCS EN LOS PULMONES DE LOS RATONES

A partir de los resultados obtenidos mediante microarrays, se quiso confirmar el efecto producido por el tratamiento de la galectina-3 en la regulación de las proteínas SOCS, analizando la expresión génica de SOCS1, SOCS3 y SOCS5 por PCR cuantitativa a tiempo real en los pulmones de los diferentes grupos de ratones.

Se incluyeron los grupos control salino, n=10 (SS) y asmático tratado con el plásmido vacío, n=15 (OVA + pEGFP), además de los grupos asmático, n=15 (OVA) y asmático tratado con el plásmido con el gen de la Gal-3, n=20 (OVA + pEGFP-GAL-3).

Los niveles de ARNm de SOCS1 y SOCS3 disminuyeron significativamente en el grupo de ratones sensibilizados a OVA y tratados con pEGFP-GAL-3, en comparación con el grupo OVA sin tratar (1,10 frente 5,69, $P < 0,001$ y 1,14 frente 3,47, $P < 0,01$; figuras 15.A y 15.B, respectivamente).

RESULTADOS

Este efecto era específico de la Gal-3 ya que la terapia con el plásmido vacío no modificó significativamente la expresión génica de SOCS1 y SOCS3 en el modelo de asma crónica.

La expresión génica de SOCS5 no experimentó cambio significativos en ninguno de los grupos analizados (Figura 15.C).

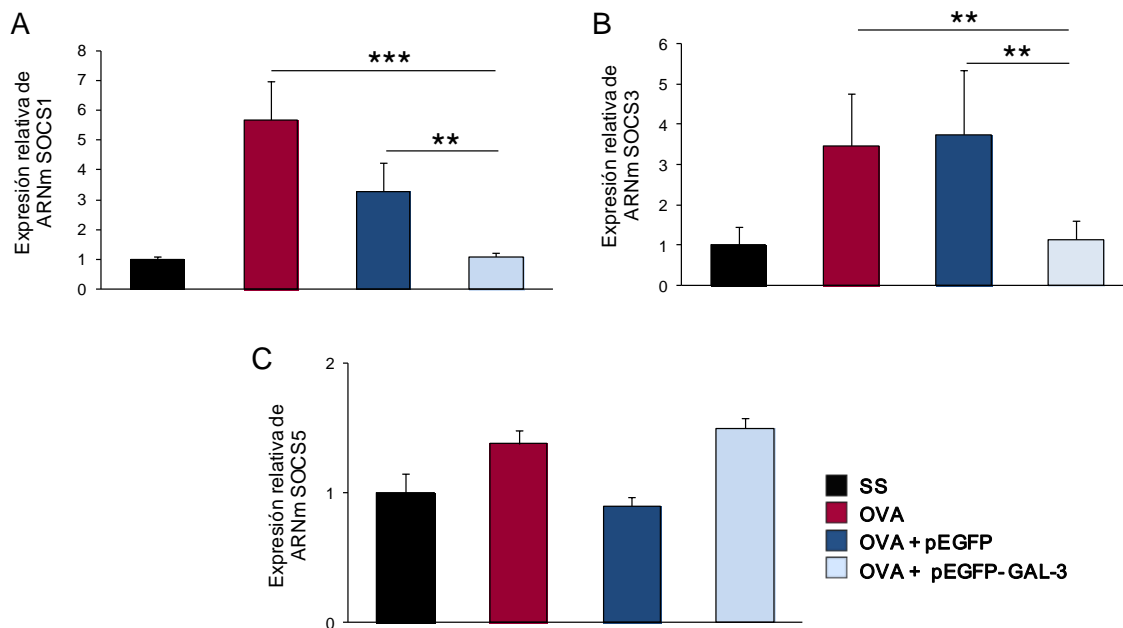


Figura 15. Expresión génica de SOCS1, SOCS3 y SOCS5 por PCR cuantitativa en pulmón. Niveles de expresión de ARNm de SOCS1 (A), SOCS3 (B) y SOCS5 (C) en pulmones de ratón procedentes de los cuatro grupos de estudio. Los valores se expresan como media \pm DE y representan la expresión génica relativa determinada por el método del $\Delta\Delta C_T$ de cada grupo tras doce semanas de exposición antigénica. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de SOCS3 y SOCS1 ($**P < 0,01$ y $***P < 0,001$) en el grupo OVA+pEGFP-GAL-3 frente a los grupos OVA y OVA+pEGFP.

La localización de la expresión de proteína SOCS3 en las vías respiratorias se realizó mediante inmunohistoquímica, en cortes de tejido pulmonar procedentes de ratones de los diferentes grupos de experimentación.

En los ratones OVA y OVA tratados con el plásmido vacío, se observaron numerosas células que expresaban SOCS3, y que se localizaban tanto en el espacio peribronquial, como en el epitelio bronquial, indicado por la presencia de coloración marrón procedente del reactivo DAB como se observa en las figuras 16.B y 16.C, respectivamente.

En cambio, en los ratones tratados con el plásmido de Gal-3 (Figura 16.D), prácticamente no se detectó expresión de SOCS3 en el tejido pulmonar analizado, de igual modo que ocurre en los ratones control (Figura 16.A).

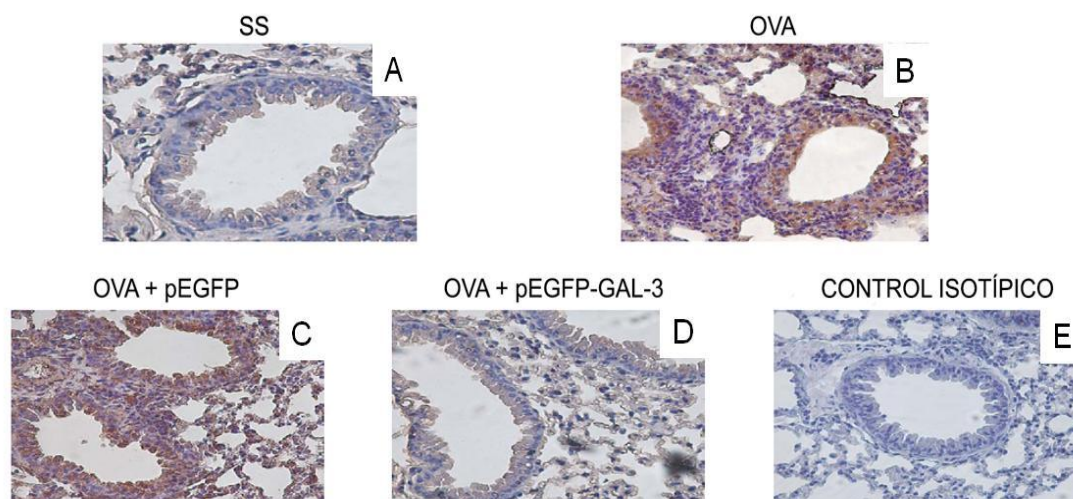


Figura 16. Detección de SOCS3 mediante la técnica de inmunohistoquímica en tejido pulmonar de ratones. A, Grupo control salino (SS); B, grupo con asma alérgica (OVA); C, grupo con asma alérgica tratado con el plásmido vacío (OVA + pEGFP); D, grupo con asma alérgica tratado con el plásmido que codifica para el gen de Gal-3; E, control isotípico empleando como anticuerpo primario anti-IgG de cabra en vez de anti-SOCS3 de cabra. Cada imagen es un ejemplo representativo de cinco ratones de cada grupo, habiéndose obtenido resultados similares de todos

El aumento de la expresión de SOCS3 en pulmones de ratones con asma alérgica crónica, y su inhibición mediante el tratamiento con el plásmido codificante para la galectina-3, que bloquea el reclutamiento de eosinófilos a las vías respiratorias, conducen al estudio hacia la investigación de este supresor en estas células claves en la regulación y ejecución de las respuestas inmunes de tipo 2, así como su papel en otras patologías Th2 como la bronquitis eosinofílica no-asmática y la esofagitis eosinofílica.

4.2. ESTUDIO DEL PAPEL DE SOCS3 EN PACIENTES CON ENFERMEDADES DE TIPO Th2: IMPLICACIÓN DE LOS EOSINÓFILOS

4.2.1. EXPRESIÓN DE SOCS3 EN EOSINÓFILOS DE PACIENTES CON ASMA Y BENA

Para comenzar el análisis de SOCS3 en patologías Th2, inicialmente se determinó si los eosinófilos, células con un papel de gran protagonismo en este tipo de respuesta inmune, eran capaces de expresar este supresor.

Para acometer este estudio, se purificaron eosinófilos de sangre periférica procedente de pacientes con dos patologías de tipo Th2 que cursan con infiltrados masivos principalmente eosinofílicos: asma y bronquitis eosinofílica-no asmática (BENA), así como de sujetos sanos.

RESULTADOS

4.2.1.1. Características clínicas de los pacientes

El análisis inicial de expresión de SOCS3 se realizó en eosinófilos purificados de sangre periférica de un total de 8 pacientes con BENA, 6 asmáticos y 9 controles sanos que fueron reclutados para el estudio. Las características clínicas de los sujetos se recogen en la tabla 7, y como se observa, no se obtuvieron diferencias significativas ni de género ni de edad, entre los tres grupos de individuos. El elevado porcentaje de IgE total detectado en el suero de los pacientes con BENA (163 kU/L) y en menor medida en los pacientes asmáticos (65,2 kU/L), refleja el perfil inmune de tipo Th2 de estas dos enfermedades.

| | Controles sanos n=9 | Bronquitis eosinofílica no-asmática (BENA) n=8 | Asma n=6 |
|--|------------------------|--|-------------------------------|
| Edad (%) | 23 (20-30) | 40 (31-55) | 37 (21-61) |
| Varones (%) | 4 (44,4) | 4 (50) | 3 (50) |
| Atopia (%) | 0 | 5 (62,5) | 3 (50) |
| VEF ₁ (%) ¹ | 105 (100-129) | 108,95 (96-115) ^c | 99,47 (73-110) ^a |
| VEF ₁ /CVF (%) ¹ | 85 (79-92) | 80,6 (74,5-89,6) | 78,91 (77,6-95,2) |
| Total IgE (kU/L) ¹ | 21,15 (4,52-144) | 163 (34,5-605) ^a | 65,2 (57,6-360) ^a |
| Eosinofilia periférica (%) | 0,14 (0-3,32) | 4,40 (1,5-8,39) ^b | 2,66 (1,34-7,92) ^a |
| Eosinofilia en esputo (%) ¹ | 2,1 (0,1-9,7) | 15,9 (2-35) | 15,1 (0,6-52,3) |

Tabla 7. Características clínicas de los sujetos del estudio de expresión de SOCS3 en eosinófilos .

CVF: capacidad vital forzada; VEF₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; ¹Mediana (rango)

^a $P < 0,05$ (versus controles sanos); ^b $P < 0,01$ (versus controles sanos); ^c $P < 0,05$ (versus pacientes asmáticos)

En relación con los valores de VEF₁, en el caso del grupo de pacientes con BENA, así como los controles sanos, se encontraron dentro del rango esperado (108,95 y 105, respectivamente) . En cambio, como era de esperar, los pacientes asmáticos presentaron un descenso significativo en el valor de este parámetro en comparación con los otros dos grupos (99,47, $P < 0,05$).

El porcentaje de eosinófilos en sangre periférica fue significativamente superior en los pacientes con BENA (4,4%) y asma (2,66%), respecto a los sujetos sanos (0,14%) de forma significativa en comparación con los dos grupos de pacientes con enfermedades Th2 ($P < 0,01$ y $P < 0,05$ respectivamente).

Por otro lado, el porcentaje de eosinófilos en esputo a pesar de ser superior en los individuos con asma (15,1%) y BENA (15,9%) que en los sujetos sanos (2,1%), no alcanzó significación estadística debido a la heterogeneidad que presentaban los grupos reflejado en los amplios rangos obtenidos (Tabla 7).

4.2.1.2. Expresión de SOCS3 en eosinófilos

El primer paso fue determinar si los eosinófilos humanos eran capaces de transcribir y traducir ARNm de SOCS3. Para ello, se purificaron eosinófilos de sangre periférica tanto de voluntarios sanos, como de pacientes con asma y bronquitis eosinofílica no-asmática (BENA).

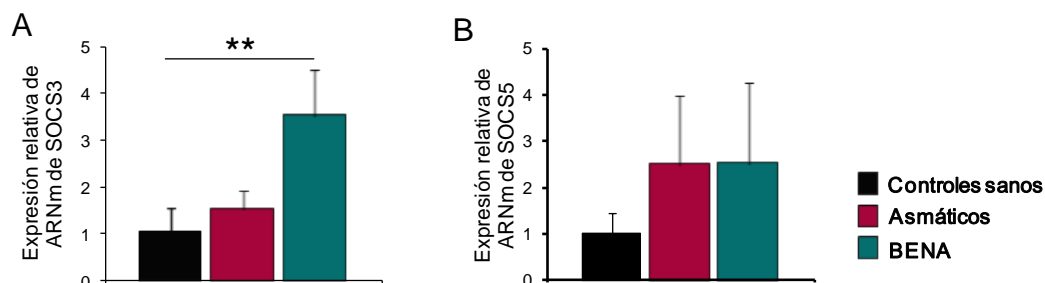


Figura 17. Expresión génica de SOCS3 y SOCS5 en eosinófilos de sangre periférica. Los niveles de ARNm de SOCS3 (A) y SOCS5 (B) se analizaron por PCR cuantitativa en eosinófilos purificados de controles sanos (media \pm DE, n=9) y pacientes con asma (media \pm DE, n=6) y BENA (media \pm DE, n=8). Los resultados representan la expresión génica relativa (** $P<0,01$).

La expresión de ARNm de SOCS3 se analizó por PCR cuantitativa (Figura 17.A). La expresión génica de SOCS3 en pacientes con asma y BENA se encontraba aumentada en comparación con la detectada en los individuos sanos (0,5 y 2,5 veces más respectivamente); siendo significativa dicha diferencia en el caso de los pacientes con BENA ($P<0,01$).

Además, se analizó la expresión génica por PCR cuantitativa, de otro supresor de la misma familia también implicado en el balance de la respuesta inmune Th2: SOCS5.

Como se observa en la figura 17.B, los niveles de ARNm de SOCS5 aparecen incrementados en los eosinófilos de los pacientes con enfermedades Th2 con respecto a los detectados en eosinófilos de los sujetos sanos, aunque sin llegar a establecerse diferencias significativas.

4.2.1.3. Identificación de SOCS3 en eosinófilos por inmunocitoquímica

Para confirmar la expresión de SOCS3 en eosinófilos se realizaron inmunocitoquímicas. La figura 18 corresponde a un ejemplo representativo de preparaciones de eosinófilos purificados procedentes de pacientes asmáticos (Figura 18.C) y con BENA (Figura 18.D), así como de controles sanos (Figura 18.B). La existencia de producto marrón, indicador de células positivas para SOCS3, fue más abundante en los pacientes con asma y BENA en comparación con los controles sanos.

La inmunorreactividad de SOCS3 se concentró en el compartimento citoplásmico, mostrando un patrón de expresión granular. El control isotópico refleja la especificidad de la técnica (Figura 18.A).

RESULTADOS

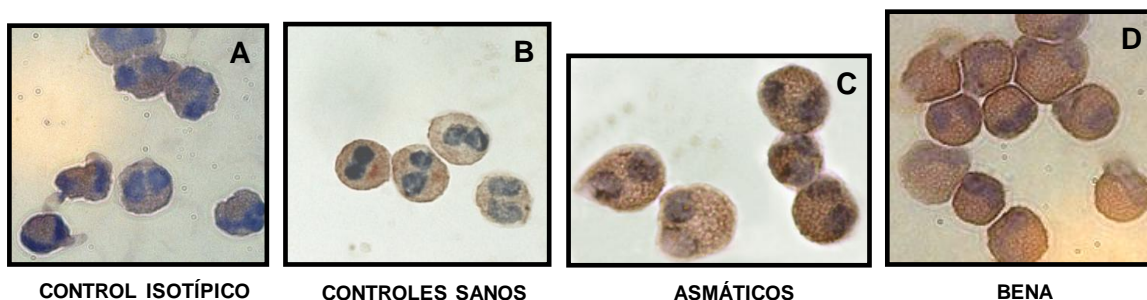


Figura 18. Expresión de SOCS3 en eosinófilos de sangre periférica de pacientes con patologías Th2 y controles sanos por inmunocitoquímica. Los eosinófilos, procedentes de pacientes con asma (B), BENA (D) o controles sanos (B), se incubaron con anticuerpo IgG de conejo de SOCS3 ó IgG de conejo como control isotípico (A) y se revelaron con un anti-conejo de cabra acoplado a la enzima peroxidasa purificada del rábano. El producto marrón indica presencia de SOCS3.

4.2.1.4. Correlación de los niveles en suero de IgE y la expresión de SOCS3

Como la elevación de los niveles de IgE en suero es una característica de los pacientes con asma y BENA (Tabla 7), se realizó la correlación entre los niveles de la medida de IgE en suero y la expresión génica de SOCS3 en sangre periférica (Figura 17.A). Se encontró una correlación positiva entre el aumento de expresión de SOCS3 y los elevados niveles de IgE en suero ($P < 0,05$, $r: 0,5$). Este resultado confirma la relación existente de la expresión de SOCS3 y las patologías Th2 con componente alérgico.

En resumen, se ha demostrado por primera vez la expresión de SOCS3 en eosinófilos de sangre periférica humana, así como el aumento de dicha expresión en los eosinófilos procedentes de pacientes con dos enfermedades Th2 como el asma y la BENA en comparación con la expresión detectada en los eosinófilos de individuos sanos.

4.2.2. EXPRESIÓN DE SOCS3 EN LA ESOFAGITIS EOSINOFÍLICA

La esofagitis eosinofílica (EoE) es la tercera patología Th2 en la que se examinó la expresión de varios miembros de la familia de proteínas SOCS, y en particular de SOCS3, además de otros factores típicos de esta respuesta inmune en los que estos supresores podrían estar ejerciendo algún efecto. En este caso, como complemento al análisis de la expresión en periferia se realizó un extenso estudio en el órgano diana afectado por la EoE: el esófago.

4.2.2.1. Descripción de los individuos reclutados para el estudio

El estudio se llevó a cabo en un total de 42 individuos, de los cuales 25 cumplían con el criterio de diagnóstico de EoE, y 17 fueron controles. En la tabla 8, se recogen resumidos, todas las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes del estudio.

| | Sujetos control (EoE-) | Pacientes con esofagitis eosinofílica (EoE+) | <i>P</i> valor ^{1,2} |
|--|---------------------------|---|-------------------------------|
| Edad (media,rango) | 38,69 (13-68) | 28,9 (9-49) | NS |
| Varones (%) | 58,8% | 88% | NS |
| Rinoconjuntivitis alérgica (%) | 29,41% | 80% | <0,005 ² |
| Alergia alimentos (%) | 18% | 44% | NS |
| IgE sérica total, kU/L (media±DE) | 271±538 | 713±1127 | <0,005 ² |
| IgE específica a alimentos (%) | 17,64% | 84% | <0,001 ² |
| IgE específica a pólenes (%) | 23,52% | 80% | <0,001 ² |
| Eosinofilia en sangre periférica (media) | 286,42±188 | 502,2±331 | <0,05 ¹ |
| Descripción endoscópica (N, %) | | | |
| ▪ Anillos | 1 (5.9) | 15 (60) | <0,001 ² |
| ▪ Surcos longitudinales | 0 (0) | 7 (28) | <0,05 ² |
| ▪ Traquealización | 1 (5.9) | 8 (32) | NS |
| ▪ Laceraciones | 0 (0) | 2 (8) | NS |
| ▪ Exudados blanquecinos | 1 (5.9) | 5 (20) | <0,005 ² |
| ▪ Hernia de hiato | 2 (11.8) | 1 (4) | NS |
| ▪ Normal | 11 (64.7) | 3 (12) | <0,001 ² |
| Recuento de eosinófilos en biopsia (media, rango) | <15 CAP | 35,8 (24-100) | |

Tabla 8. Características epidemiológicas, clínicas y endoscópicas de los pacientes de estudio.

¹Test de Mann-Whitney ; ²Test de Fisher; NS: no significativo; CAP, campo de alto poder

La edad media fue de 28,9 años para los sujetos con EoE, y 38,6 años para los controles, sin existir diferencias significativas entre ambos grupos. Cinco pacientes con EoE y un control eran sujetos con edad pediátrica. En la distribución del género no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos, aunque en ambos grupos, el sexo masculino fue predominante (88% en pacientes con EoE y 59% en sujetos sin EoE).

Al comparar el historial atópico entre los sujetos de estudio, veinte de los pacientes con EoE (80%) estaban sensibilizados al menos a un aeroalérgeno, en comparación con los individuos control, de los que sólo cuatro (23,5%) presentaban esta característica ($P<0,001$). Además, el 80% de los pacientes con EoE cursaban con rinoconjuntivitis de tipo alérgica, frente a un 29,41% de los controles ($P<0,005$). En cuanto a las alergias alimentarias, once pacientes con EoE (44%) tenían IgE específica para algún alimento, mientras que en sólo tres sujetos control (18%) se detectó IgE específica frente a alimentos.

El recuento de eosinófilos en sangre periférica también experimentó diferencias entre el grupo EoE y el grupo control (502,2±331 frente a 286±188,4, $P<0,05$). En este sentido, la IgE total sérica detectada fue superior en los pacientes con EoE en comparación con los sujetos sin esta patología (712 ± 1125 frente a 271±538 $P<0,05$).

RESULTADOS

Por último, las características observadas endoscópicamente también aparecen descritas en la tabla 8. La presencia de anillos ($P<0,001$), exudados blanquecinos ($P<0,005$), y surcos longitudinales ($P<0,05$), fueron los rasgos más importantes y comunes en los pacientes con EoE, mientras que en los sujetos sin EoE los esófagos eran en su mayoría normales ($P<0,001$). Las biopsias del esófago proximales, medias y distales realizadas en los pacientes con EoE, confirmaron la existencia de más de 15 eosinófilos por campo; sin embargo en los controles, el número de eosinófilos fue inferior a 15, en cualquiera de las tres regiones evaluadas.

4.2.2.2. Aumento de la expresión génica de SOCS1 y SOCS3 en biopsias de esófago proximal de pacientes con EoE

Se analizó la expresión de SOCS1, SOCS3 y SOCS5 en biopsias de esófago proximal procedentes de 25 pacientes con EoE y 17 controles, para determinar los niveles de ARNm de estos tres miembros de la familia de supresores SOCS por PCR cuantitativa.

Los niveles de ARNm específico de SOCS3 y SOCS1 en los pacientes con EoE eran tres veces más elevados que los niveles de estos mismos supresores en las biopsias de esófago de los controles sin EoE (Figuras 19.A y B respectivamente, $P<0,05$).

La expresión de SOCS5 era igual entre pacientes con EoE y pacientes sin EoE (Figura 19.C).

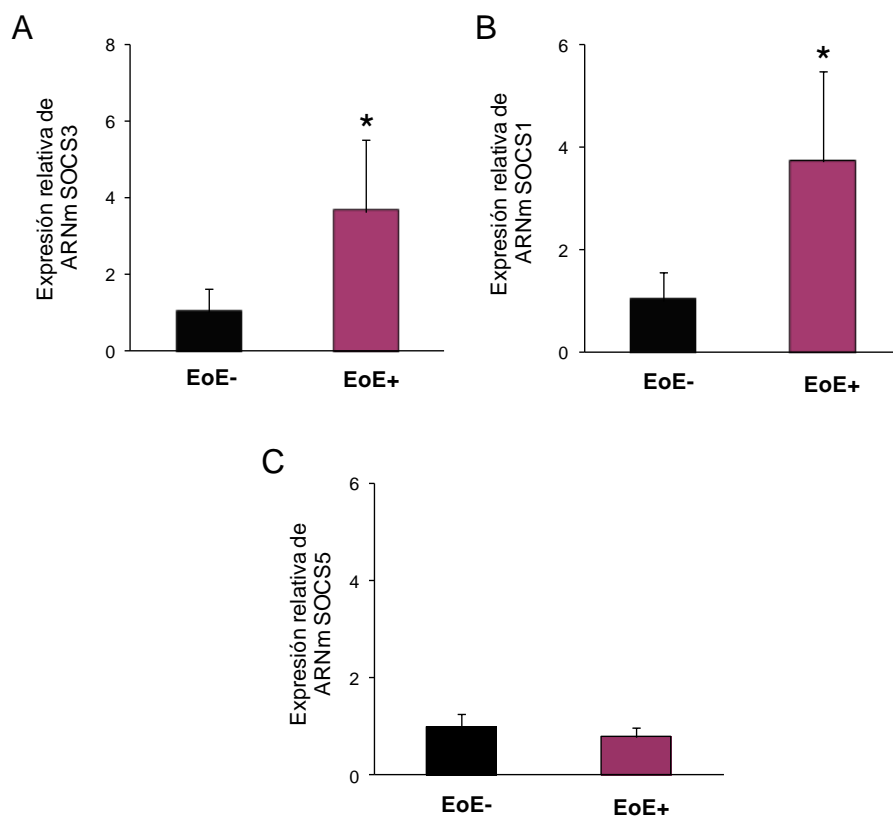


Figura 19. Medida de la expresión génica de SOCS3, SOCS1 y SOCS5 en biopsias proximales de pacientes con EoE y sujetos control por PCR cuantitativa. Los resultados muestran la expresión génica relativa de SOCS3 (A) y SOCS1 (B) en 25 pacientes con EoE y 17 controles sanos (media \pm DE; * $P<0,05$).

4.2.2.3. El eje eotaxina-3/CCR3 y las citocinas Th2, IL-5 e IL-13, aumentan la expresión de SOCS3 en pacientes con esofagitis eosinofílica

Una vez constatado el aumento de expresión génica de SOCS1 y SOCS3, se evaluaron los niveles de transcritos de otros genes previamente implicados en la EoE y relacionados directamente con la respuesta inmune Th2, como son las interleucinas IL-5 e IL-13, el factor quimiotáctico eotaxina-3 y su receptor CCR3 (Figura 20).

En las biopsias de esófago proximal de los pacientes con EoE, se encontró una elevada expresión génica de IL-5, IL-13, CCR3 y eotaxina-3 (figura 20) en comparación con los pacientes control (incremento en número de veces de 89,7; 10,5; 5,9 y 86,5 respectivamente, $P < 0,05$).

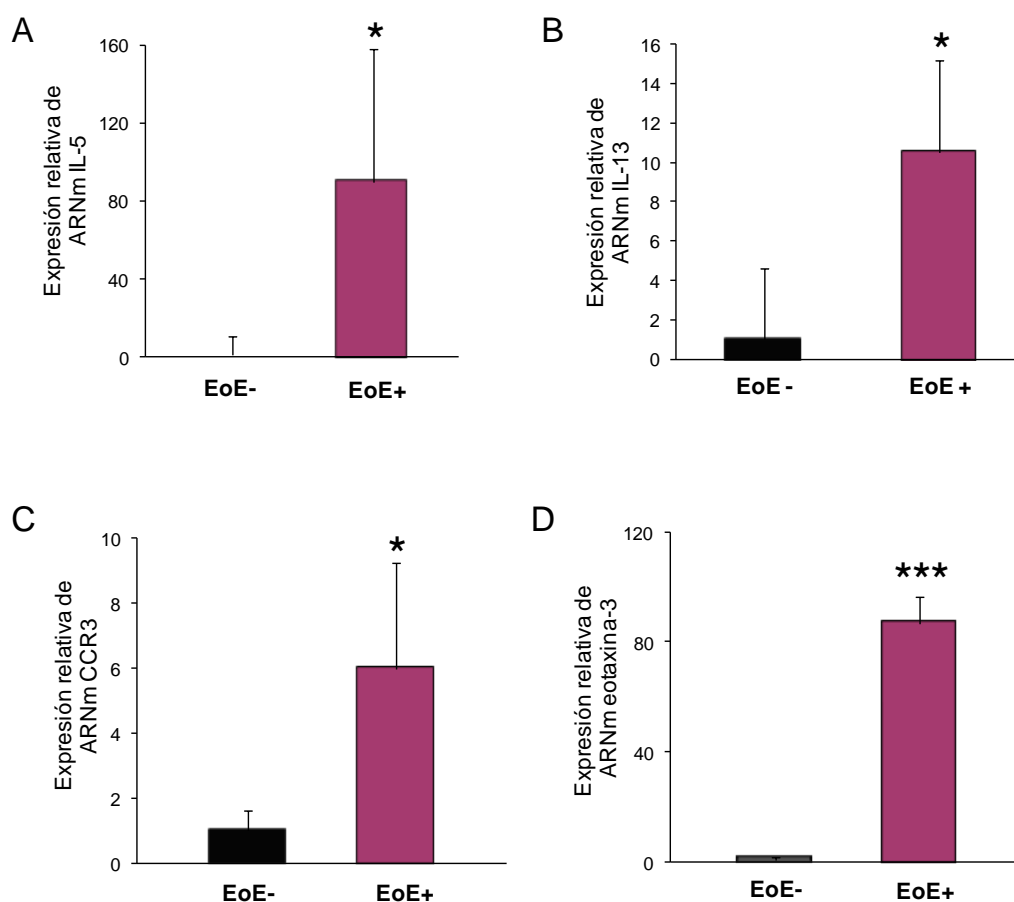


Figura 20. Expresión de factores Th2 en biopsias proximales de pacientes con EoE. Se determinaron los niveles relativos de ARNm de IL-5 (A), IL-13 (B), CCR3 (C) y eotaxina-3 (D) por PCR cuantitativa. Grupo EoE- (n=17) y grupo EoE+ (n=25) representados como media ± DE (* $P < 0,05$).

El aumento de expresión en el esófago, de IL-5, CCR3 y eotaxina-3 ha sido descrito anteriormente en otras cohortes de pacientes con EoE. Sin embargo, la elevación de los niveles de IL-13 es novedosa; por ello se realizaron una serie de inmunohistoquímicas de IL-13 en las biopsias proximales de esófago de pacientes con EoE para confirmar su expresión en el tejido.

RESULTADOS

Como se observa en la figura 21, se detectaron células positivas para IL-13, como indica la presencia de coloración marrón, tanto en el foco inflamatorio como en algunas células del epitelio según muestra el aumento de la imagen (*panel derecho*).

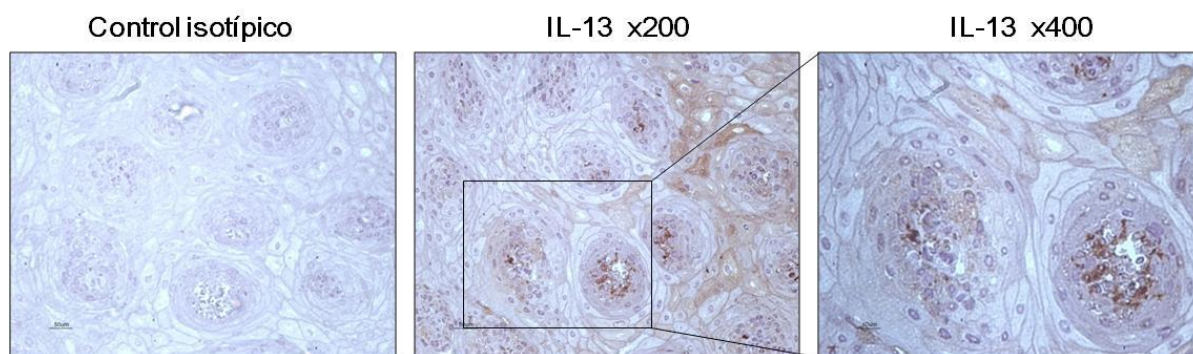


Figura 21. Detección de IL-13 en biopsias de esófago de pacientes con EoE. Inmunohistoquímica representativa de IL-13 de biopsia de paciente con EoE de un total de 5 realizadas. El color marrón indica positividad (*panel central y derecho*, x200 y x400 aumentos respectivamente). Control negativo (*panel izquierdo*): anticuerpo isotípico.

4.2.2.4. Implicación de la vía ERK en la patología de la esofagitis eosinofílica

SOCS3 regula muchas vías de transducción de señales, entre ellas la ruta de MAPK/ERK, por lo tanto se decidió examinar la activación de esta ruta. En un primer paso, los niveles de ARNm de MAPK1 se analizaron por PCR cuantitativa en las biopsias de esófago proximal para comprobar la producción de ARNm de este intermediario de la vía.

En las biopsias de pacientes con EoE la expresión de ARNm de MAPK1 era 1,3 veces superior que en los sujetos control ($P < 0,001$, figura 22.A).

A continuación se evaluó la activación de la ruta a nivel proteico mediante la detección y cuantificación de proteína ERK fosforilada. En la figura 22.B se observa un aumento de la fosforilación de ERK en las biopsias de los pacientes con EoE, casi inexistente en los sujetos control (3,3 veces más, $P < 0,001$, figura 22.C).

Por último se localizó la expresión proteica de fosfo-ERK en el tejido esofágico mediante inmunohistoquímica en pacientes con EoE. Como se puede comprobar en la imagen representativa (Figura 22.D), la expresión de ERK fosforilado se distribuye homogéneamente en todo el corte esofágico. En conjunto estos datos implican a esta vía de transducción de señales directamente en la fisiopatología de la esofagitis eosinofílica.

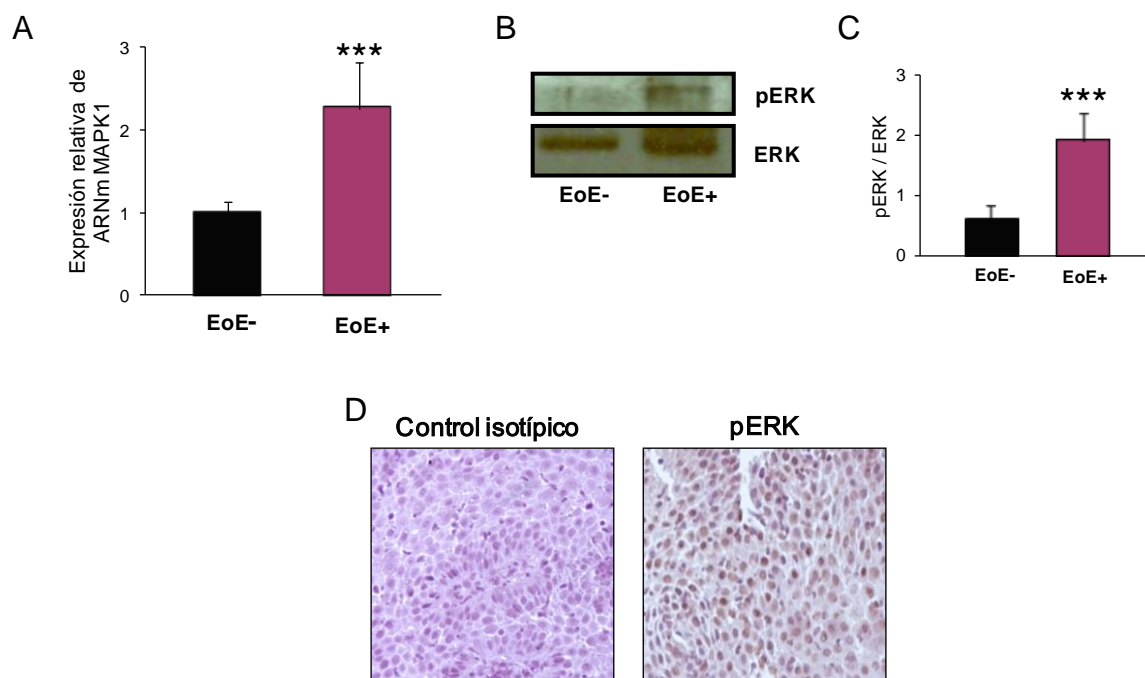


Figura 22. Activación de la vía ERK en la esofagitis eosinofílica. A. PCR cuantitativa de MAPK1 en biopsias de esófago proximal de 25 pacientes con EoE y 17 sujetos control (media \pm DE, *** $P < 0,001$). B. Detección mediante western blot de fosfo-ERK y ERK en extractos de biopsias de esófago proximal de pacientes con EoE y sujetos control. C. Cuantificación de la expresión de pERK por densitometría (media \pm DE, $n=5$ /grupo, *** $P < 0,001$). D. Inmunohistoquímica de pERK en biopsias de esófago proximal de pacientes con EoE. Se utilizó un anticuerpo isotópico como control de la técnica. El producto coloreado indica presencia de anticuerpo pERK ($n=5$, $\times 400$).

4.2.2.5. Correlación de SOCS3 con los genes analizados

Para establecer una relación entre el aumento de la expresión génica de SOCS1 y SOCS3 y los genes alterados medidos en el estudio de esta enfermedad se realizaron correlaciones con el resto de genes estudiados y características propias de la EoE.

En los pacientes con EoE los niveles de ARNm de SOCS3 se correlacionan con la eosinofilia tanto esofágica como periférica ($r=0,46$, $P < 0,05$), estableciéndose así una relación directa entre la expresión de SOCS3 y el carácter eosinofílico de la enfermedad.

Además se realizaron correlaciones entre los genes cuya expresión génica ha sido encontrada elevada en las biopsias de esófago de pacientes con EoE del estudio y la expresión detectada en las mismas muestras de SOCS1 y SOCS3. Todas las correlaciones llevadas a cabo fueron significativas indicando una relación entre el aumento de ARNm de SOCS1 y/o SOCS3 y el incremento de cualquiera de los genes analizados, excepto en el caso de la IL-13 donde la correlación sólo fue significativa para SOCS1 pero no para SOCS3 (Tabla 9).

| | SOCS1 | SOCS3 |
|------------|----------------------|----------------------|
| SOCS3 | <0,0001 ($r=0,90$) | |
| IL-5 | <0,0001 ($r=0,80$) | 0,0004 ($r=0,70$) |
| Eotaxina-3 | <0,0001 ($r=0,60$) | 0,0007 ($r=0,50$) |
| CCR3 | <0,0001 ($r=0,59$) | <0,0001 ($r=0,68$) |
| IL-13 | <0,01 ($r=0,36$) | NS ($r=0,25$) |
| MAPK1 | <0,0001 ($r=0,70$) | <0,0001 ($r=0,63$) |

Tabla 9. Correlaciones entre SOCS (SOCS1 y SOCS3) y los genes determinados en el estudio en las biopsias esofágicas. Correlación de Spearman r y valores P obtenidos mediante el test no-paramétrico.

La correlación positiva encontrada entre la expresión de SOCS1 y SOCS3 y los genes Th2, corroboran la participación de esta familia de supresores en el mantenimiento de esta respuesta inmune característica, típica de la enfermedad.

4.2.2.6. La expresión de SOCS3 y el perfil de citocinas no se modifican en los pacientes con EoE en comparación con los sujetos control en células de sangre periférica y suero

El análisis de la expresión de SOCS3 quiso acometerse, además de en el órgano principalmente afectado por la enfermedad, en células de sangre periférica y suero (Figura 23).

La determinación de los niveles de ARNm de SOCS3, tanto en células mononucleares (Figura 23.A) como en eosinófilos (Figura 23.B) de sangre periférica, no reveló diferencias de este supresor entre el grupo de pacientes con EoE y el grupo control, presentando ambos una expresión muy similar.

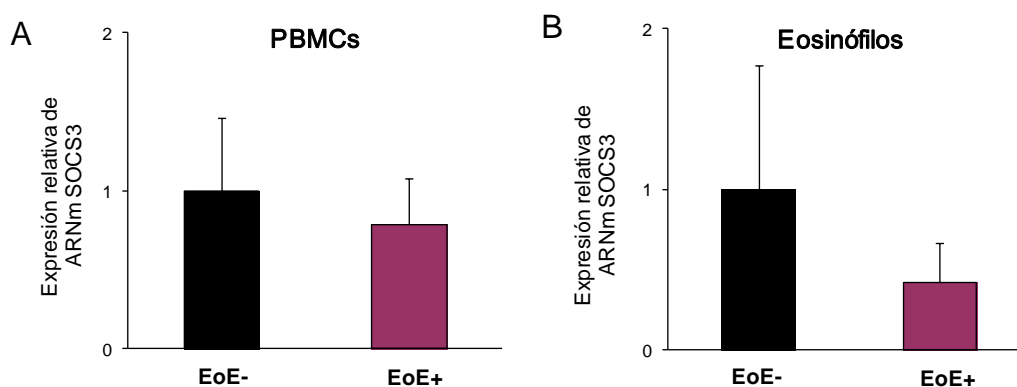


Figura 23. Determinación de SOCS3 a nivel sistémico en pacientes con EoE y controles. PCR cuantitativa de SOCS3 en PBMC (A) y eosinófilos (B) purificados de sangre periférica de pacientes con EoE (media \pm DE, $n=25$ y sujetos control (media \pm DE, $n=17$).

Para analizar de forma más detallada el perfil de los mediadores implicados en el proceso inflamatorio, se realizó un array de citocinas en el que se incluía un panel extenso de estos factores. La medida se llevó a cabo en dos *pools* diferentes de suero: pacientes con EoE y controles. De nuevo, no se obtuvieron diferencias destacables en los patrones de expresión de las diferentes citocinas ensayadas entre los dos grupos (Figura 24.A).

Por último, se decidió corroborar los resultados mediante ELISA de dos de los factores incluidos en el array: IL-5 y VEGF; esta vez, en todos los sueros procedentes de los sujetos del estudio de forma individual. Una vez más, no se pudieron extraer diferencias relevantes entre el grupo de pacientes con EoE y los controles en ninguno de los dos casos (Figuras 24.B y 24.C).

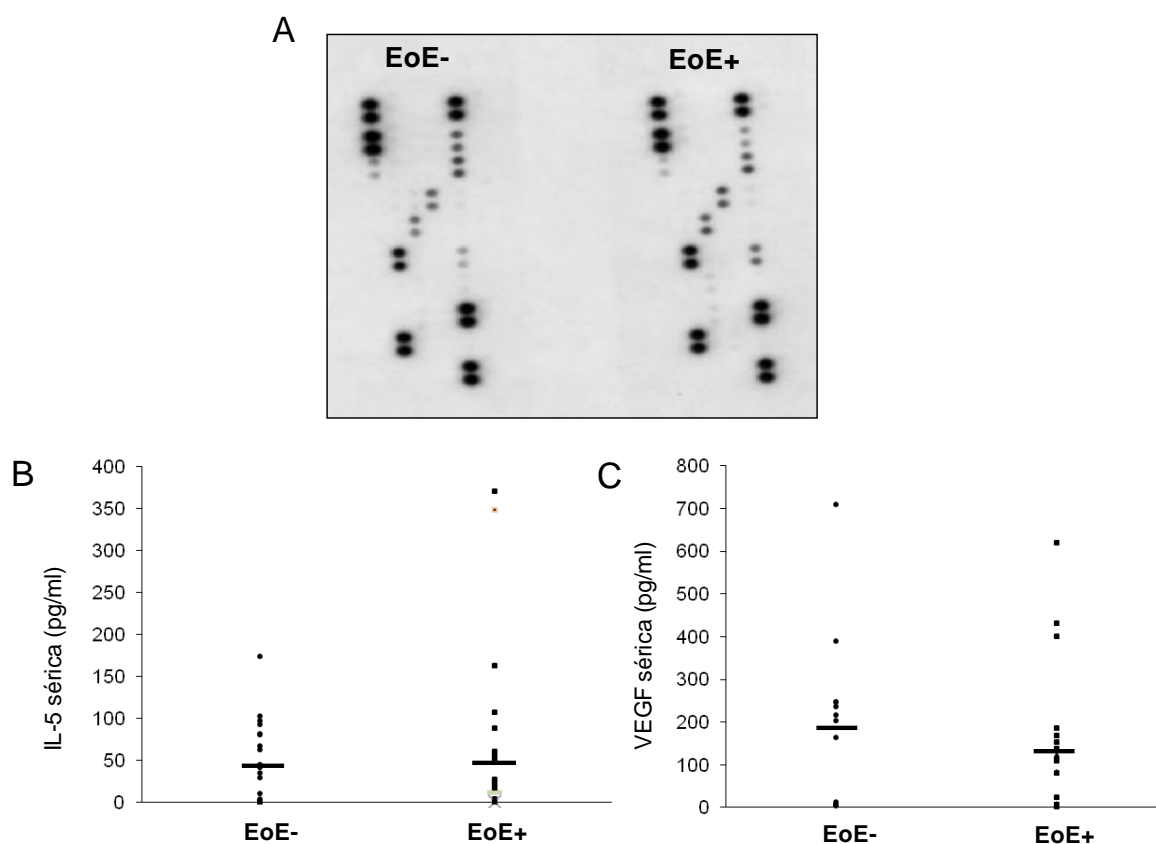


Figura 24. Perfil de citocinas en suero de pacientes con EoE y controles. (A) Array de de citocinas humanas realizado a partir de dos *pools* de sueros procedentes de muestras de suero de pacientes con EoE y individuos controles. Medidas de ELISA de IL-5 (B) y VEGF (C) en muestras de suero de 25 pacientes con EoE y 17 controles.

4.2.2.7. Modificación de la expresión de SOCS3 en el esófago de pacientes con EoE sometidos a dieta de restricción

De los 25 pacientes con EoE, cinco fueron sometidos a una dieta de eliminación total de determinados alimentos entre los que se incluyen leche, soja, trigo, huevos, cacahuetes y pescados/mariscos. Transcurridos 3 meses, se les volvió a practicar una biopsia del esófago para analizar, entre otros parámetros, la expresión génica de SOCS3 y SOCS1.

RESULTADOS

Los resultados indican una reducción de 3,1 veces en la expresión de SOCS3 tras la dieta de eliminación, que inicialmente presentaban un incremento de este supresor (Figura 25.A, $P<0,01$).

Por el contrario, los niveles de ARNm de SOCS1, no se vieron modificados por el tratamiento de eliminación de alimentos (Figura 25.B).

Estos datos confirman la implicación de SOCS3 en la EoE y su potencial como posible biomarcador de la enfermedad.

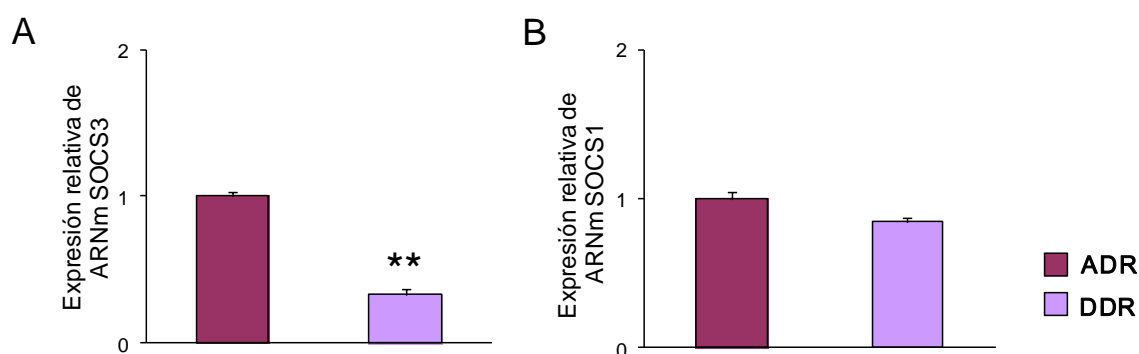


Figura 25. Expresión génica de SOCS3 y SOCS1 en pacientes con EoE tras la dieta de eliminación. PCR cuantitativa de SOCS3 (A) y (B) a partir de biopsias de esófago de cinco pacientes con EoE, antes y después de haberse sometido a una dieta de restricción (ADR, antes de la dieta de restricción y DDR, después de la dieta de restricción). Los resultados se representan como media \pm DE, ** $P<0,01$.

El incremento de expresión de SOCS3 en las biopsias de esófago de los pacientes se suma a la elevación de los niveles de este supresor encontrada en otras dos patologías Th2 con presencia de eosinófilos: asma y bronquitis eosinofílica. En estas dos últimas enfermedades además se ha constatado un aumento de SOCS3 en los eosinófilos, por tanto se decide centrar el estudio en la modulación directa de SOCS3 en los eosinófilos.

4.2.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SOCS3 POR DIVERSOS FACTORES

Una vez confirmada la expresión de SOCS3 en eosinófilos humanos y su aumento en los eosinófilos procedentes de pacientes con enfermedades de tipo Th2 como el asma y la BENA, se analizaron los factores afectan a su regulación.

4.2.3.1. Estimulación de la expresión génica de SOCS3 por citocinas Th2 pero no Th1

La expresión génica de SOCS3 se evaluó por PCR cuantitativa en eosinófilos purificados de sangre de controles sanos estimulados *in vitro* con citocinas características de un ambiente Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), y también Th1 (IFN- γ e IL-2).

Cuando los eosinófilos eran cultivados con cualquiera de las tres citocinas de tipo Th2: IL-4, IL-5 o IL-13, se obtuvo un aumento de la expresión de SOCS3 dependiente tanto de la dosis como del tiempo de incubación empleado (Figura 26).

De todas las dosis de concentración utilizadas, el mayor incremento de expresión de SOCS3 observado se consiguió con 10 ng/ml de cualquiera de las tres interleucinas ensayadas (Figura 26. A, B y C).

Cabe destacar el elevado aumento de expresión génica de SOCS3 obtenido en los eosinófilos estimulados con IL-5 (hasta 14 veces más, respecto con el control sin tratar), en comparación con las inducciones producidas por IL-4 e IL-13 ($P < 0,05$, Figura 26.B).

Este aumento de SOCS3 debido a la IL-5, se explica por la importancia de esta citocina en la diferenciación y supervivencia del eosinófilo y el hipotético papel que SOCS3 desempeñaría en el eosinófilo regulando dicha actividad.

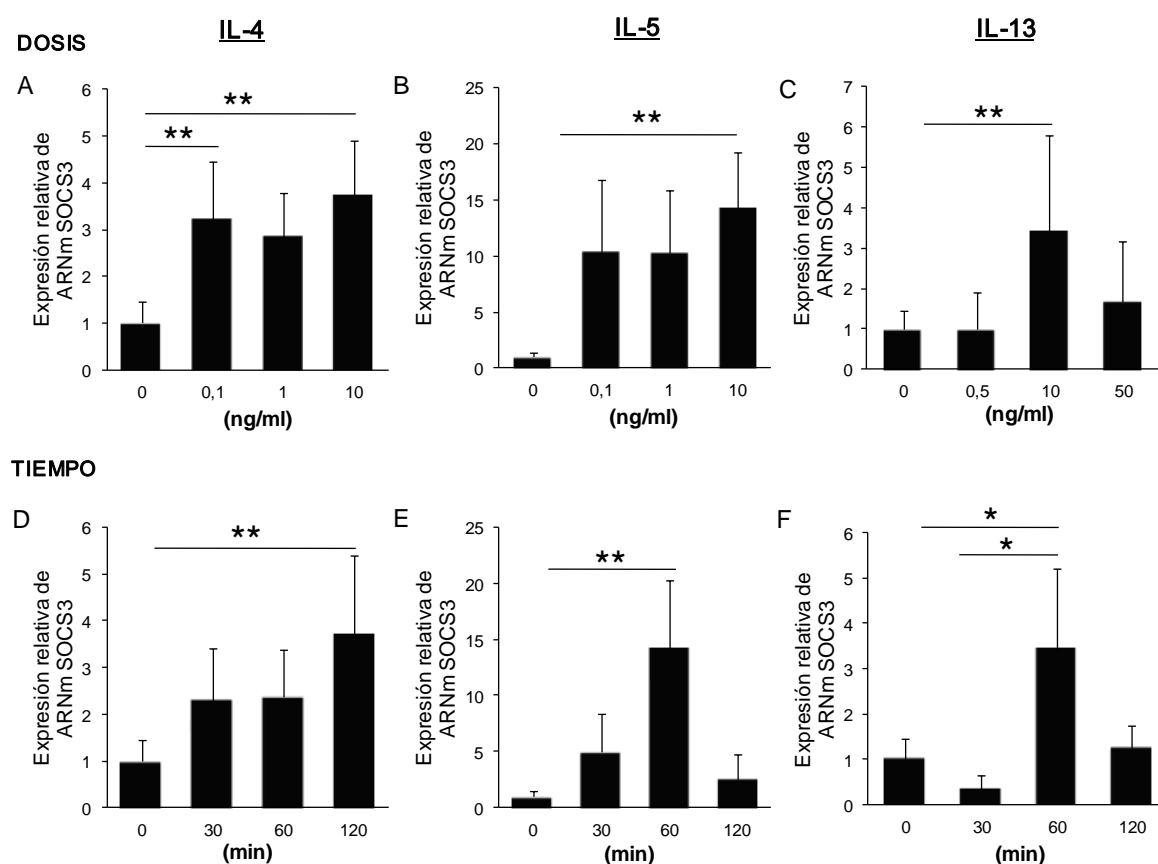


Figura 26. Expresión de SOCS3 en eosinófilos de sangre periférica tratados con citocinas Th2. Los eosinófilos fueron cultivados con diferentes dosis y a diferentes tiempos para obtener curvas respuesta de dosis (A-C) y tiempo (D-F) para las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. La expresión de ARNm de SOCS3 fue medida por PCR cuantitativa en cuatro individuos sanos (media \pm DE). Los resultados representan la expresión génica relativa (** $P < 0,01$, * $P < 0,05$).

RESULTADOS

Las cinéticas, todas ellas realizadas con la dosis de 10 ng/ml, presentaron un patrón dependiente con el tiempo, alcanzándose la mayor expresión a los 120 minutos con IL-4 (Figura 26.D, $P<0,01$) y a los 60 minutos con IL-5 e IL-13 (Figura 26.E y F, $P<0,05$).

En cambio, las estimulaciones con $\text{INF}\gamma$ (Figura 27.A y B) no variaron la expresión génica de SOCS3 de forma significativa a ninguna de las dosis ni tiempos ensayados en comparación con los eosinófilos sin estimular, pero si pudo observarse una tendencia al incremento de la expresión de SOCS3 a medida que se aumentaba tanto la dosis de $\text{INF}\gamma$ como el tiempo de estimulación.

Estos datos apuntan hacia una posible modulación de este factor en la expresión de SOCS3 en los eosinófilos.

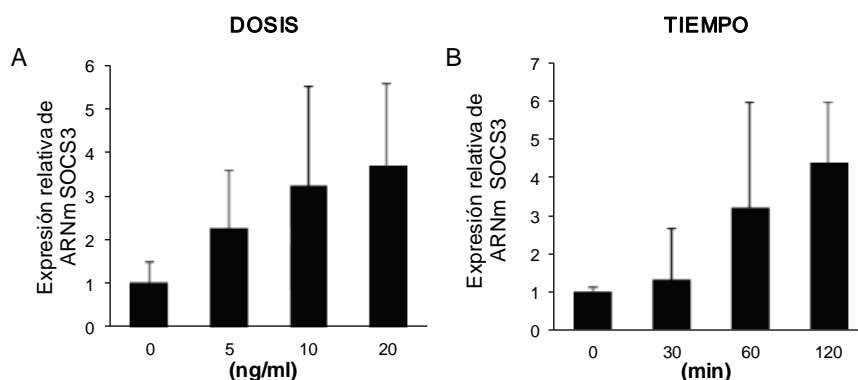


Figura 27. Expresión de SOCS3 en eosinófilos de sangre periférica estimulados con $\text{INF}\gamma$. Los eosinófilos purificados de sujetos sanos, fueron cultivados con diferentes dosis de $\text{INF}\gamma$ a diferentes tiempos para obtener curvas respuesta de dosis (A) y tiempo (B). La expresión de ARNm de SOCS3 fue medida por PCR cuantitativa en cuatro individuos sanos (media \pm DE). Los resultados representan la expresión génica relativa.

4.2.3.2. El tratamiento con PGE_2 incrementa la expresión de SOCS3 en eosinófilos de controles sanos

La prostaglandina E_2 (PGE_2) es un prostanoide generado a partir del ácido araquidónico que posee un carácter pleiotrópico, ejerciendo efectos tanto pro-inflamatorios como anti-inflamatorios. Durante el proceso inflamatorio fomenta la inducción y persistencia del fenotipo Th2. Por tanto, se decidió evaluar, la expresión génica de SOCS3 en eosinófilos de controles sanos estimulados con PGE_2 .

Se ensayaron diferentes concentraciones de PGE_2 (10^{-4} y 10^{-6}M) para estimular los eosinófilos purificados de sangre de controles sanos, y seguidamente se determinó de nuevo la expresión génica de SOCS3 por PCR cuantitativa (Figura 28).

Tanto la dosis de 10^{-6} como de 10^{-4}M resultaron efectivas estimulando la expresión de ARNm de SOCS3 en los eosinófilos en comparación con los eosinófilos sin tratar (Figura 28.A). Además se constató que el aumento de los niveles de ARNm era mayor al tiempo de estimulación de 120 minutos con una dosis de PGE_2 de 10^{-6}M (Figura 28.B).

Por lo tanto, el incremento de expresión de SOCS3 es dosis y tiempo-dependiente y alcanza significación estadística a la dosis de 10^{-4} M en un periodo de estimulación de 120 minutos ($P<0,01$).

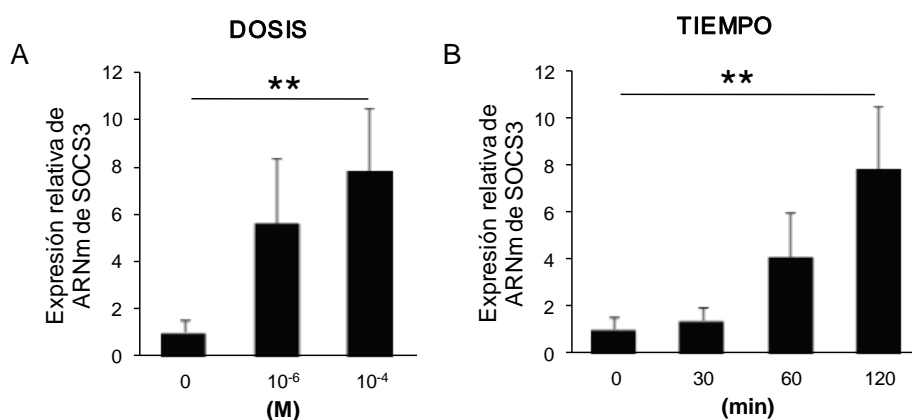


Figura 28. Estimulación de la expresión de SOCS3 con PGE₂. Eosinófilos purificados de sangre periférica de voluntarios sanos se cultivan con diferentes dosis de PGE₂ (A) y a diferentes tiempos (B) y se mide la expresión génica de SOCS3 por PCR cuantitativa. La expresión de ARNm de SOCS3 fue medida por PCR cuantitativa en cuatro individuos sanos (media±DE) y representada como expresión génica relativa determinada por el método del $\Delta\Delta C_t$, (** $P<0,01$).

En conjunto, de estos resultados se puede decir que los eosinófilos humanos purificados de sangre periférica son capaces de transcribir y expresar SOCS3, a través de una regulación dirigida por las citocinas Th2 y PGE₂ que incrementan los niveles de ARNm de SOCS3 de forma dependiente de la dosis y el tiempo.

4.2.4. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE SOCS3 EN EOSINÓFILOS DE PACIENTES ASMÁTICOS: SILENCIAMIENTO GÉNICO DE SOCS3

Dado que el objetivo principal de la tesis se centra en el análisis de la expresión de SOCS3 y su posible implicación terapéutica en el asma, se decidió evaluar la relación existente entre este supresor y los eosinófilos mediante la herramienta del silenciamiento génico, esta vez únicamente en individuos con asma.

4.2.4.1. Descripción clínica de los pacientes asmáticos seleccionados para el estudio.

Siguiendo los mismos criterios de inclusión que para el análisis inicial de expresión de SOCS3 en eosinófilos humanos, fueron seleccionados los 36 pacientes asmáticos que comprenden el estudio de la función de SOCS3 mediante su silenciamiento génico.

De las características clínicas de los pacientes representadas en la tabla 10, cabe destacar la eosinofilia periférica superior al 3% y el valor de fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO) por encima de 25 ppm que se considera como un marcador subrogado de eosinofilia en las vías

RESULTADOS

respiratorias de los pacientes. Ambos parámetros apuntan a una elevada presencia de eosinófilos en estos pacientes clasificados en un fenotipo asmático altamente Th2.

| | Asma n=36 |
|----------------------------|----------------|
| Edad (años) | 46 (20-86) |
| Varones (%) | 11 (28,2) |
| Atopia (%) | 29 (74,2) |
| VEF ₁ (%) | 100 (73-138) |
| VEF ₁ /CVF (%) | 79 (62-100,4) |
| FeNO ppm | 31 (8,5-230) |
| Eosinofilia periférica (%) | 4,7 (1,5-19,1) |

Tabla 10. Características clínicas de los pacientes asmáticos empleados para el estudio de silenciamiento génico de SOCS3 en eosinófilos .

CFV, capacidad vital forzada

VEF₁, volumen espiratorio forzado en el primer segundo

ppm, partes por millón

¹Mediana (rango)

4.2.4.2. Silenciamiento génico de SOCS3 en eosinófilos purificados de sangre de pacientes asmáticos

Para establecer la importancia funcional de SOCS3 en los eosinófilos procedentes de pacientes asmáticos se ha utilizado el silenciamiento génico.

El silenciamiento génico de SOCS3 se lleva a cabo siguiendo el protocolo establecido por Goplen y colaboradores, aprovechando que los eosinófilos son capaces de captar de manera espontánea pequeños ácidos nucleicos como el ARNsi, en un proceso de endocitosis activo mediado por dinamina II [202]. Los eosinófilos purificados de sangre periférica de los pacientes fueron cultivados durante un periodo de 48 horas en medio RPMI sin antibiótico, para evitar la degradación de los ARNsi al ser añadidos al cultivo, en presencia de IL-5 y GM-CSF.

En primer lugar se comprobó la efectividad del silenciamiento génico de SOCS3, evaluando la expresión de SOCS3 en los eosinófilos a través de la determinación de los niveles de ARNm así como de proteína. Se confirmó que el tratamiento de los eosinófilos con el ARNsi de SOCS3 producía una inhibición de la expresión génica y proteica de SOCS3. Se obtuvo un 56% de reducción de la expresión génica de SOCS3 en comparación con el control negativo (Figura 29.A), y por western blot se detectó hasta 26 veces menos de expresión de SOCS3 en los eosinófilos que habían recibido el *pool* de ARN silentes en comparación con el control negativo, desapareciendo casi por completo la expresión proteica de SOCS3 (Figura 29.B).

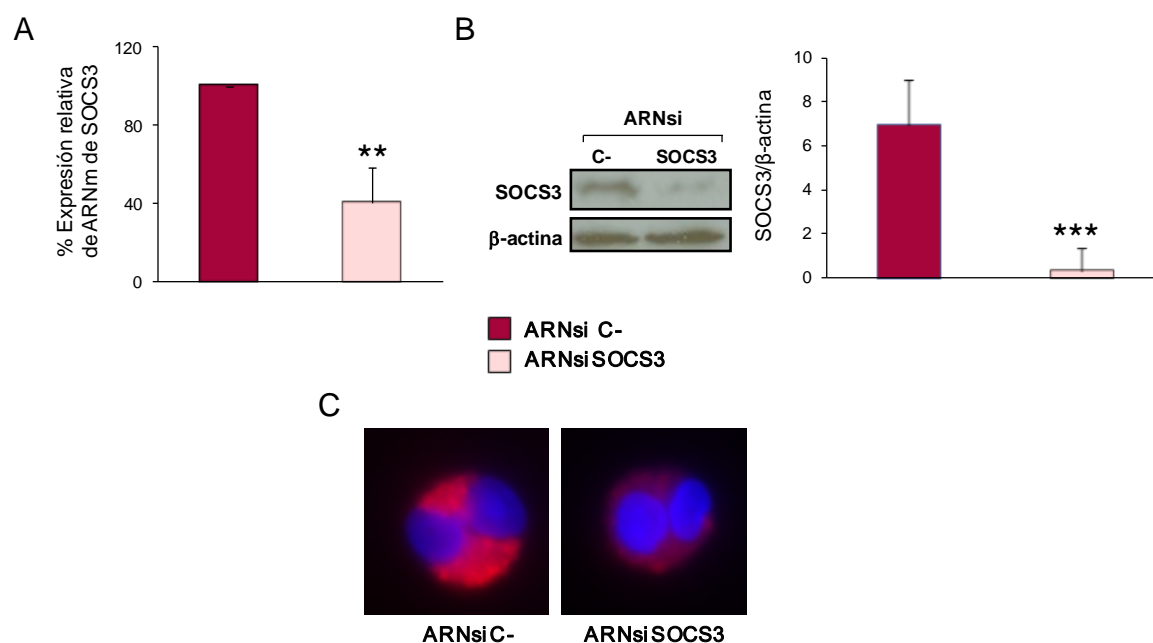


Figura 29. Silenciamiento génico de SOCS3 en eosinófilos humanos purificados de sangre de pacientes asmáticos. Los eosinófilos fueron cultivados durante 48 horas, bien con el ARNsi de SOCS3 bien con el control negativo de silenciamiento y se analizó la expresión de SOCS3 por PCR cuantitativa, $n=8$ (A), western blot, $n=8$ (B), o microscopía confocal, $n=2$ (C). Los resultados se expresan como la media obtenida \pm DE (** $P<0,01$, *** $P<0,001$).

También se evaluó la disminución de la expresión de SOCS3 *ex vivo* mediante microscopía de fluorescencia. Como se observa en la figura 29.C, la intensidad del marcaje de SOCS3 disminuye en el eosinófilo procedente del cultivo con ARNsi de SOCS3, mientras que en el eosinófilo tratado con el control negativo de silenciamiento se detecta gran cantidad de fluorescencia roja repartida por todo el citoplasma celular.

A continuación, se evaluó la expresión génica de SOCS1 y SOCS5, para comprobar si el silenciamiento génico de SOCS3 en eosinófilos era específico y no afectaba a estos dos supresores aunque pertenecieran a la misma familia de proteínas (Figura 30).

Ni los niveles de ARNm de SOCS1 ni los de SOCS5 (Figuras 30.A y B, respectivamente), experimentaron cambios significativos tras el tratamiento de los eosinófilos con el ARNsi de SOCS3, en comparación con aquéllos que se incubaron con el control negativo de silenciamiento.

RESULTADOS

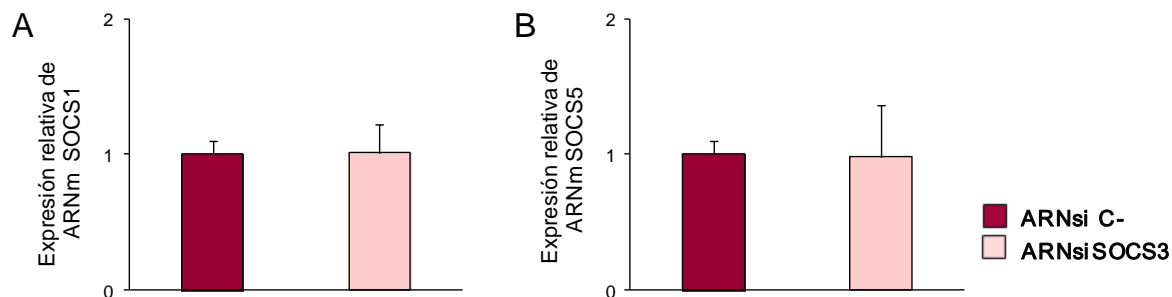


Figura 30. Determinación de la expresión génica de SOCS1 y SOCS5 en eosinófilos de pacientes asmáticos. Análisis de los niveles de ARNm de SOCS1 (A) y SOCS5 (B) por PCR cuantitativa en eosinófilos purificados de sangre periférica incubados con el ARNsi de SOCS3 o bien con el control negativo de ARNsi. Los resultados se expresan como la media obtenida de 5 pacientes \pm DE.

4.2.4.3. Análisis de los factores reguladores más importantes de la respuesta inmune en los eosinófilos tras el silenciamiento génico de SOCS3

Para caracterizar con más detalle el fenotipo inmune de los eosinófilos tras el silenciamiento génico, se analizó la expresión génica de los factores reguladores de la transcripción GATA-3, T-bet y FoxP3; de los cuales, el único descrito en eosinófilos con anterioridad a este estudio es GATA-3 [211].

La expresión de SOCS3 ayuda a promover y mantener las respuestas de tipo Th2. La reducción de la expresión de este supresor disminuyó los niveles de ARNm de GATA-3, el factor de transcripción máster en la programación de las células hacia un fenotipo Th2 característico (Figura 31.A, $P < 0,05$). En cambio, la expresión génica del factor de transcripción T-Bet, fundamental en la generación de un fenotipo inmune Th1, no sufrió modificaciones significativas (Figura 31.B).

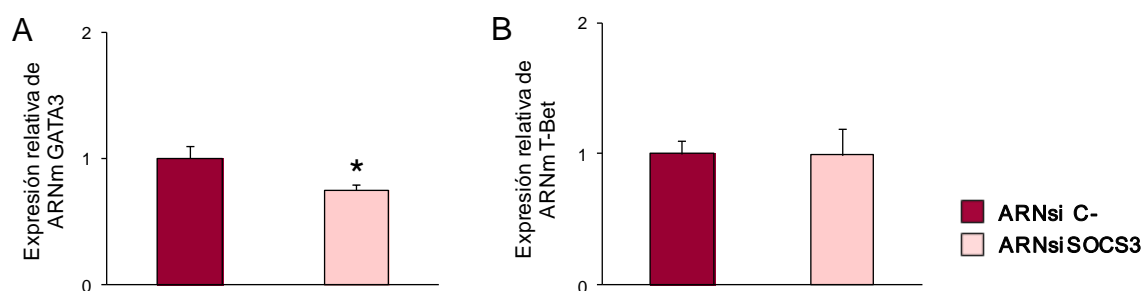


Figura 31. Modulación de la respuesta inmune Th1/Th2 por SOCS3 en eosinófilos de pacientes con asma. Determinación de la expresión génica por PCR cuantitativa de GATA3 (A), T-Bet (B), en eosinófilos purificados de sangre periférica incubados con el ARNsi de SOCS3 o bien con el control negativo de ARNsi. Los resultados se expresan como la media obtenida de 5 pacientes \pm DE (** $P < 0,05$).

El análisis de los factores implicados en la expresión de un fenotipo regulador, como son FOXP3 y la IL-10, reveló una reducción significativa de los niveles de ARNm de ambos en los eosinófilos incubados con el ARN silente de SOCS3 en comparación con los tratados con el ARNsi control negativo (Figuras 32. A y B, respectivamente $P < 0,05$).

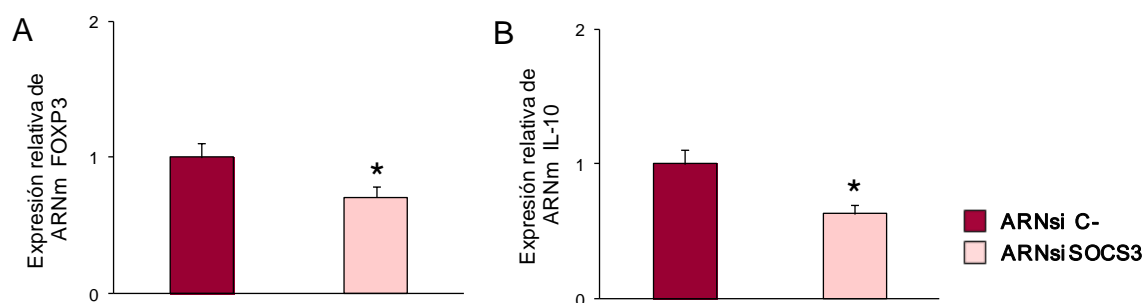


Figura 32. Implicación de SOCS3 en la respuesta inmune reguladora en eosinófilos de pacientes asmáticos. Determinación de la expresión génica por PCR cuantitativa de FOXP3 (A) e IL-10 (B), en eosinófilos purificados de sangre periférica incubados con el ARNsi de SOCS3 o bien con el control negativo de ARNsi. Los resultados se expresan como la media obtenida de 5 pacientes \pm DE (** $P < 0,05$).

En resumen, cabe destacar la expresión génica de T-bet y FOXP3 descrita por primera vez en eosinófilos humanos purificados de sangre periférica en este trabajo. Además, la ausencia de SOCS3 atenúa el fenotipo mixto Th2/Treg, disminuyendo los niveles de GATA-3 y FOXP3/IL-10 respectivamente, sin afectarse la expresión del regulador de la transcripción Th1, T-Bet.

4.2.4.4. Supresión de la migración de los eosinófilos tratados con el ARNsi de SOCS3

La migración de los eosinófilos desde la medula ósea hasta las zonas de inflamación a través de los vasos sanguíneos, es una de las acciones clave que deben de realizar los eosinófilos; por lo que se evaluó, si la capacidad migratoria de los eosinófilos se veía afectada tras el silenciamiento génico de SOCS3.

Se determinó la capacidad migratoria de los eosinófilos a través de una membrana con un tamaño de poro de $0,5\mu\text{m}$, en respuesta a una concentración de IL-5 de 10 ng/ml al otro lado de la membrana. Los eosinófilos en los que la expresión de SOCS3 estaba silenciada, migraron un 46% menos a través del inserto que aquéllos que habían captado el ARNsi control negativo (Figura 33, $P < 0,05$).

RESULTADOS

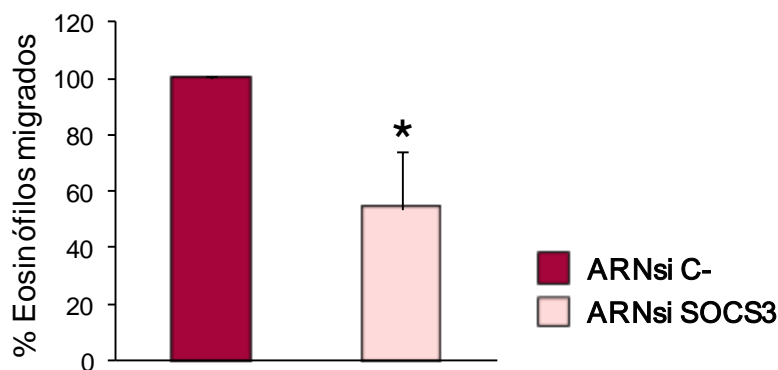


Figura 33. Afectación de la migración de eosinófilos de pacientes asmáticos con SOCS3 silenciado. Migración de eosinófilos a través de una membrana con un poro de 0.5 μ m, en respuesta a IL-5 (10 ng/ml) tras cultivarse con los ARNsi (de SOCS3 o C-). Los resultados se expresan como la media obtenida de 6 pacientes \pm DE (** $P < 0,05$).

Para encontrar un posible mecanismo de actuación a través del cual SOCS3 pudiera modular la migración de los eosinófilos, se midió por citometría de flujo los niveles de expresión del receptor de eotaxina-3 (CCR3) que está directamente implicado en la migración del eosinófilo. En concordancia con la disminución de la capacidad migratoria, el porcentaje de células positivas para CCR3 se redujo en un 76 % en los eosinófilos cultivados con el ARNsi de SOCS3 en comparación con los controles negativos (Figura 34, $P < 0,05$). La estimulación específica con IL-5 disminuyó en un 52 % la expresión del receptor CCR3 en los eosinófilos con deficiencia de proteína SOCS3 frente a los eosinófilos sin alteración de la expresión del supresor (Figura 34, $P < 0,05$).

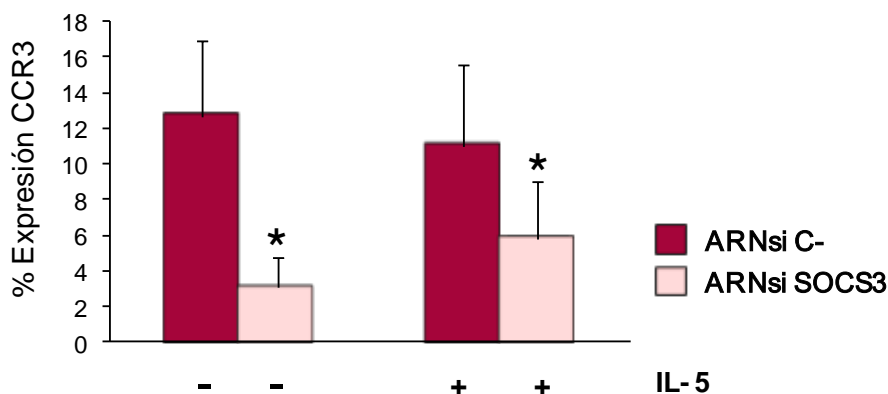


Figura 34. Determinación de la expresión del receptor CCR3 en eosinófilos de pacientes asmáticos. Porcentaje de expresión de CCR3 medido por citometría de flujo en eosinófilos tratados con ARNsi de SOCS3 ó un ARNsi control y estimulados con ó sin IL-5. Los resultados se expresan como la media obtenida de 6 pacientes \pm DE. (** $P < 0,05$).

Estos datos apuntan a una implicación de SOCS3 en la regulación de la migración de los eosinófilos, posiblemente a través de un incremento de expresión en superficie del receptor de eotaxina CCR3, independientemente de la estimulación con IL-5 que no modifica significativamente los niveles de CCR3 en los eosinófilos.

4.2.4.5. Reducción de la adhesión en eosinófilos con expresión deficiente de SOCS3

La adhesión del eosinófilo al endotelio vascular es fundamental para que tenga lugar su extravasación al foco inflamatorio donde ejercerá su función efectora. De nuevo, se purificaron eosinófilos de sangre periférica de pacientes asmáticos y se cultivaron con el ARNsi de SOCS3 ó la secuencia de ARNsi aleatoria que actuaba como control negativo durante 48 h. Seguidamente, los eosinófilos se estimularon con diferentes citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) ó con PGE₂, a los tiempos y dosis en los que la inducción de SOCS3 era mayor (capítulo resultados, apartado 4.2.3).

Los eosinófilos que expresaban menos SOCS3 debido al tratamiento silente, presentaban una inhibición de la adhesión de un 25 % al ser cultivados con IL-5, IL-13 ó PGE₂ ($P<0,05$, figura 35). Sin embargo, la estimulación con IL-4 no produjo ninguna variación significativa en la capacidad de adhesión entre los eosinófilos tratados con ARNsi control o de SOCS3.

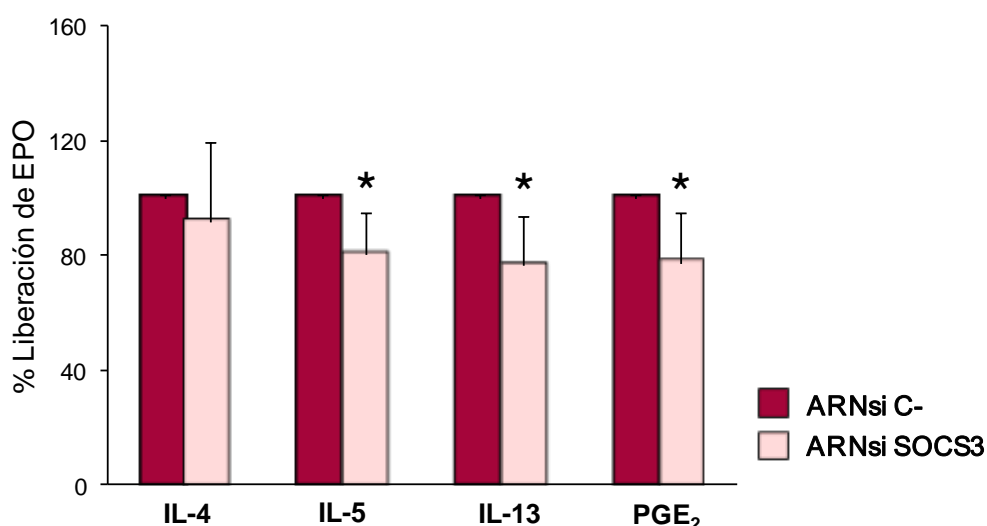


Figura 35. Evaluación de la adhesión en eosinófilos de pacientes tras el silenciamiento de SOCS3. Medida indirecta a través de la cantidad de EPO liberada (absorbancia a 630nm) por eosinófilos (tratados con ARNsi de SOCS3 o control negativo) adheridos a una placa recubierta con fibronectina estimulados previamente con citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) o PGE₂. Los resultados se expresan como la media obtenida de 7 pacientes \pm DE para cada estímulo (* $P<0,05$).

A continuación se estudió la expresión de las principales moléculas implicadas en el proceso de adhesión en los eosinófilos purificados de los pacientes asmáticos para determinar si existía una relación entre los niveles de SOCS3 y la expresión en superficie de estas proteínas fundamentales para que los eosinófilos interaccionen con el endotelio vascular y se extravasen a las zonas de inflamación. Para ello, los eosinófilos se estimularon con IL-5, y se incubaron con los siguientes anticuerpos marcados: ICAM-1, LFA-1, VCAM-1, VLA4 e integrina- α 2.

El análisis mediante citometría de flujo reveló una disminución general de la expresión de los cuatro marcadores de adhesión analizados en los eosinófilos tratados con el ARNsi de SOCS3 independientemente de la estimulación con IL-5 (Figura 36).

RESULTADOS

Sin embargo, únicamente las moléculas LFA-1 e integrina- α 2 experimentaron una reducción de su expresión en un 53 y 49 % respectivamente en los eosinófilos tratados con el ARNsi de SOCS3 frente a los eosinófilos incubados con el control negativo de ARNsi, tras ser estimuladas ambas condiciones con IL-5 ($P<0,05$).

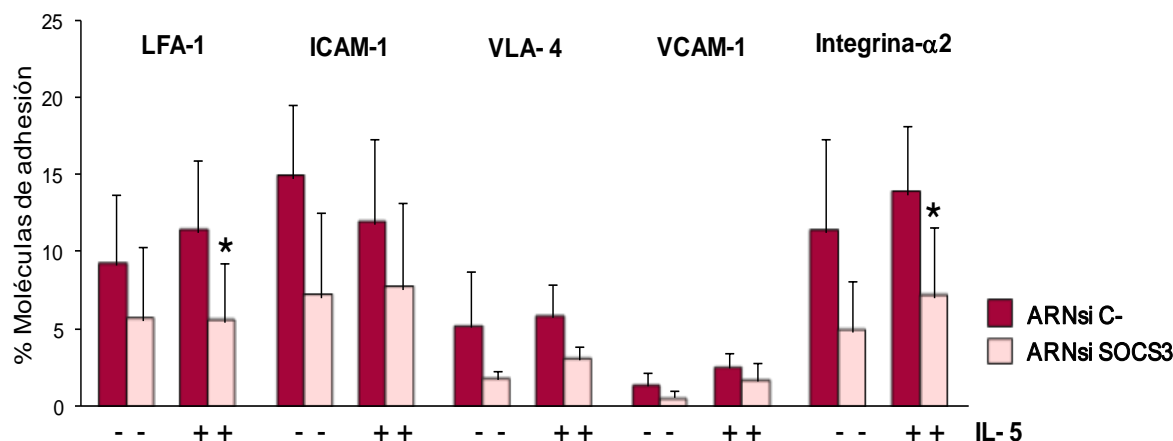


Figura 36. Análisis de la expresión de moléculas de adhesión en eosinófilos de pacientes con asma tras el silenciamiento de SOCS3. Porcentajes de expresión de fluorescencia de ICAM-1 PE, LFA-1 FITC, VCAM-1 FITC, VLA4 PE e integrina- α 2 FITC obtenidos por citometría de flujo en eosinófilos purificados de sangre. Los resultados se expresan como la media obtenida de 7 pacientes \pm DE para cada estímulo (* $P<0,05$).

El aumento general de las moléculas implicadas en adhesión en la superficie de los eosinófilos procedentes de pacientes asmáticos, principalmente de LFA-1 y la integrina- α 2, mediado por IL-5, pero también posiblemente por IL-13 y PGE₂, potencia la capacidad de adhesión de éstas células.

4.2.4.6. Recuperación de la degranulación de los eosinófilos con expresión reducida de SOCS3

La degranulación de los eosinófilos en pacientes asmáticos se ve atenuada al incubarse con citocinas Th2 y PGE₂, a las dosis en las que la expresión de SOCS3 se induce [212]. Cuando se silenció la expresión de SOCS3 en los eosinófilos y se estimularon con IL-4, IL-5, IL-13 ó PGE₂, en todos los casos, se observó un incremento de la capacidad de degranulación medida por un aumento de la liberación de EPO (Figura 37).

Los porcentajes de recuperación de la degranulación fueron de 73, 104, 108 y 41 tras la estimulación con, IL-4, IL-5, IL-13 y PGE₂ respectivamente. El incremento de la degranulación fue significativamente estadístico en el caso de los eosinófilos silenciados y estimulados con IL-4, IL-5 e IL-13 ($P<0,05$, figura 37).

Estos resultados apuntan a un control de la degranulación de los eosinófilos a través de un incremento de SOCS3 producido por la estimulación con citocinas Th2.

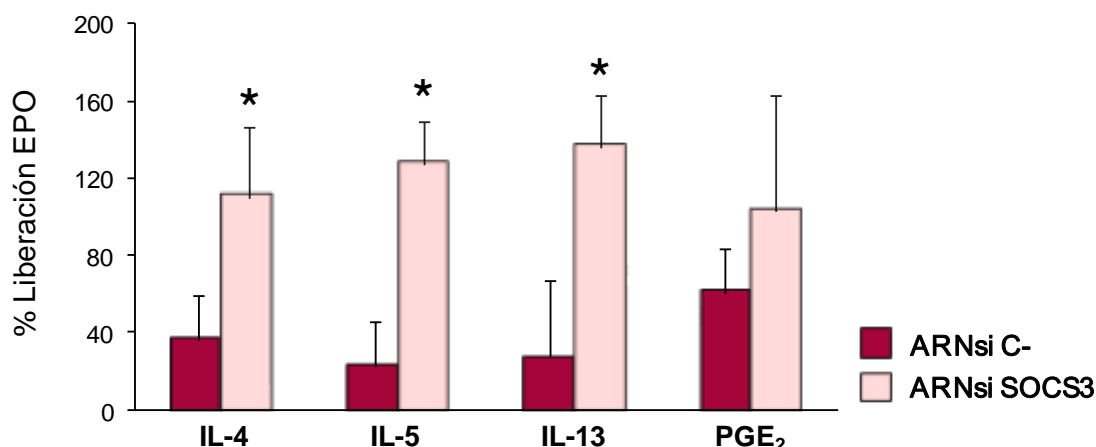


Figura 37. Aumento de la degranulación en eosinófilos de pacientes asmáticos tras silenciar la expresión de SOCS3. Los eosinófilos humanos purificados (tratados con ARNsi de SOCS3 o control negativo) se incubaron con IL-4, IL-5, IL-13, y PGE₂ y a continuación se estimularon con C5a (300nM) para inducir degranulación durante 30 minutos a 37°C. La liberación de EPO se determinó por fotometría. Los datos representan la media obtenida de 8 pacientes \pm DE para cada estímulo (* $P < 0,05$).

4.2.4.7. Evaluación de las vías de señalización JAK/STAT y Ras/ERK

SOCS3 ejerce su función principalmente inhibiendo la actividad de los intermediarios que constituyen las vías de señalización. Consecuentemente, se quiso evaluar el estado de fosforilación de STAT3 y ERK, componentes de las vías de transducción de señales JAK/STAT y MAPK/ERK respectivamente, en los eosinófilos purificados de pacientes asmáticos tratados o no con el ARNsi de SOCS3 (Figura 38).

Como se observa en la figura 38.A, el silenciamiento de SOCS3 aumenta la fosforilación del transductor STAT3 en los eosinófilos, manteniéndose intactos los niveles de STAT3 sin fosforilar.

En cambio, en los eosinófilos incubados con el ARNsi de SOCS3 no se modificó el estado de fosforilación de ninguna de las isoformas de ERK: ERK1 y ERK2, en relación con los eosinófilos tratados con el ARNsi control negativo (Figura 38.B).

Estos datos indican a un control de SOCS3 de la activación de la ruta JAK/STAT, pero no de la ruta MAPK/ERK, en los eosinófilos purificados de sangre periférica de pacientes asmáticos.

RESULTADOS

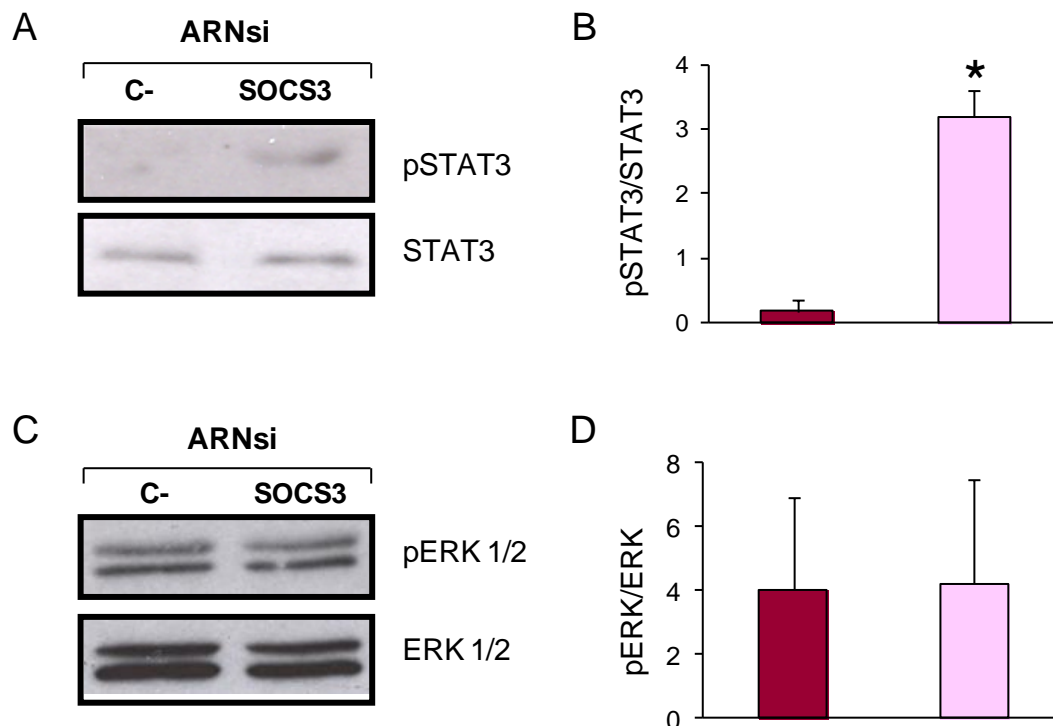


Figura 38. Activación de las vías JAK/STAT y RAS/ERK. Western blot de pSTAT3 y STAT3 (A) y pERK y ERK(C), procedente de lisados de eosinófilos purificados tratados con ARNsi de SOCS3 o control negativo de silenciamiento durante 48 horas y estimulados posteriormente con IL-5 durante 1 hora y las respectivas cuantificaciones tras la densitometría de las bandas de pSTAT3/STAT3 (B) y pERK/ERK (D). Los datos representan la media obtenida de 3 pacientes \pm DE para cada estímulo (* $P < 0,05$).

En resumen, los resultados obtenidos en eosinófilos de pacientes asmáticos *in vitro* relacionan de forma directa a SOCS3 con una serie de funciones muy importantes durante la vida del eosinófilo como la migración, la adhesión y la degranulación. Además, su expresión favorece la transcripción del factor principal en la polarización de la respuesta inmune Th2: GATA-3, así como la expresión de factores fundamentalmente reguladores como son FOXP3 e IL-10. Todo ello apunta hacia la importancia de la expresión de SOCS3 en la patología asmática orquestada en aquellos fenotipos altamente Th2 y eosinofílicos.

4.3. TERAPIA INTRANASAL DE SILENCIAMIENTO GÉNICO DE SOCS3 EN UN MODELO ANIMAL DE ASMA CRÓNICA

Los elevados niveles de SOCS3 encontrados en el asma y otras patologías Th2, relacionados directamente con la modulación de la actividad de diversas células inmunes que participan en la respuesta Th2, entre las que se encuentran los eosinófilos, perfilan a SOCS3 como una potencial diana terapéutica para el tratamiento del asma crónica. Para ello, se lleva a cabo un nuevo modelo animal de asma crónica en el que mediante la técnica de silenciamiento génico a través de la administración del ARNsi de forma intranasal, se decide reducir la expresión de SOCS3 en los pulmones.

4.3.1. LOCALIZACIÓN PULMONAR DEL ARNsi TRAS SU INSTILACIÓN INTRANASAL EN RATONES

Antes de comenzar la terapia de silenciamiento de SOCS3, fue necesario evaluar la capacidad del ARNsi para llegar íntegro al pulmón de los ratones. Se administró intranasalmente un ARNsi control (específico para el ARNm del endógeno ciclofilina B) conjugado con un fluoróforo (rodamina) para poder rastrearlo mediante microscopía de fluorescencia, en ausencia de vehículo. La fluorescencia se detectó mediante un microscopio confocal a una longitud de onda de 547 nm.

En la figura 39 se observa en los cortes de pulmón, una intensa fluorescencia localizada principalmente en las regiones de epitelio peribronquial de los pulmones, tanto a las 24 como a las 48 horas de ser instilado el ARN silente a la dosis de 2 μ M. En cambio, en los ratones que no habían recibido el ARNsi marcado, no se aprecia fluorescencia específica en ninguna región pulmonar.

De estos resultados se concluye que el ARNsi “desnudo” administrado intranasalmente es capaz de alcanzar el tejido pulmonar durante su trayecto a través de las vías respiratorias.

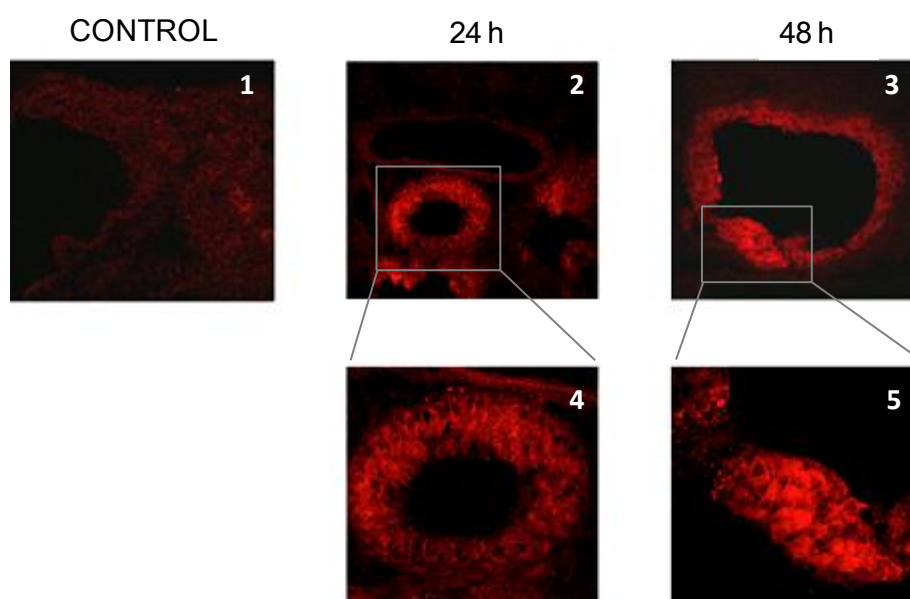


Figura 39. Detección en pulmones de ratón de ARNsi control marcado con Rodamina administrado intranasalmente, mediante microscopía confocal. (1) Pulmón de ratón a las 48 h de recibir intranasalmente agua destilada. Imágenes de pulmones a las 24 h (2 y 4) y a las 48 h (3 y 5) de la administración del ARNsi del gen de la ciclofilina B (2 μ M), marcado con rodamina.

4.3.2. INHIBICIÓN DE SOCS3 EN LOS PULMONES MEDIANTE LA TERAPIA DE SILENCIAMIENTO GÉNICO

El silenciamiento génico de SOCS3 se realiza en ratones a los que se les ha inducido asma alérgica crónica mediante la sensibilización al antígeno OVA, según se detalla en el capítulo de resultados en el apartado 3.1.2. En total los ratones recibieron 10 dosis del ARNsi de SOCS3 o bien del ARNsi control negativo de forma intranasal.

RESULTADOS

La expresión de SOCS3 se analizó en los pulmones de los ratones tanto a nivel génico como proteico por PCR cuantitativa y western blot en los diferentes grupos del modelo (Figura 40).

En la figura 40.A, se observa la inhibición de la expresión génica de SOCS3 en los pulmones del grupo de ratones que habían recibido el ARNsi de SOCS3 respecto a la detectada en los dos grupos sensibilizados a OVA sin recibir la terapia de silenciamiento específica. En comparación con el grupo OVA la reducción de la expresión de SOCS3 en el grupo de ratones tratados con ARNsi fue de un 38,8%; mientras que si se comparaba la expresión de SOCS3 en el grupo OVA tratado con el ARNsi de SOCS3 con los ratones del grupo OVA ARNsi C- la disminución de la expresión de SOCS3 tras el silenciamiento génico era de un 48 %, alcanzando significación estadística ($P<0,05$).

El análisis de expresión proteica de SOCS3 en los diferentes grupos, concuerda con los resultados obtenidos en la evaluación de los niveles de ARN mensajero (Figura 40.B). La inhibición de la expresión de SOCS3 en los ratones tratados con el ARNsi de SOCS3, contrasta con el aumento de dicha expresión que tiene lugar en los grupos asmáticos OVA y OVA ARNsi C-, estableciéndose diferencias significativas (50 % y 39 % de reducción, $P<0,001$ y $P<0,05$ respectivamente, figura 40.C).

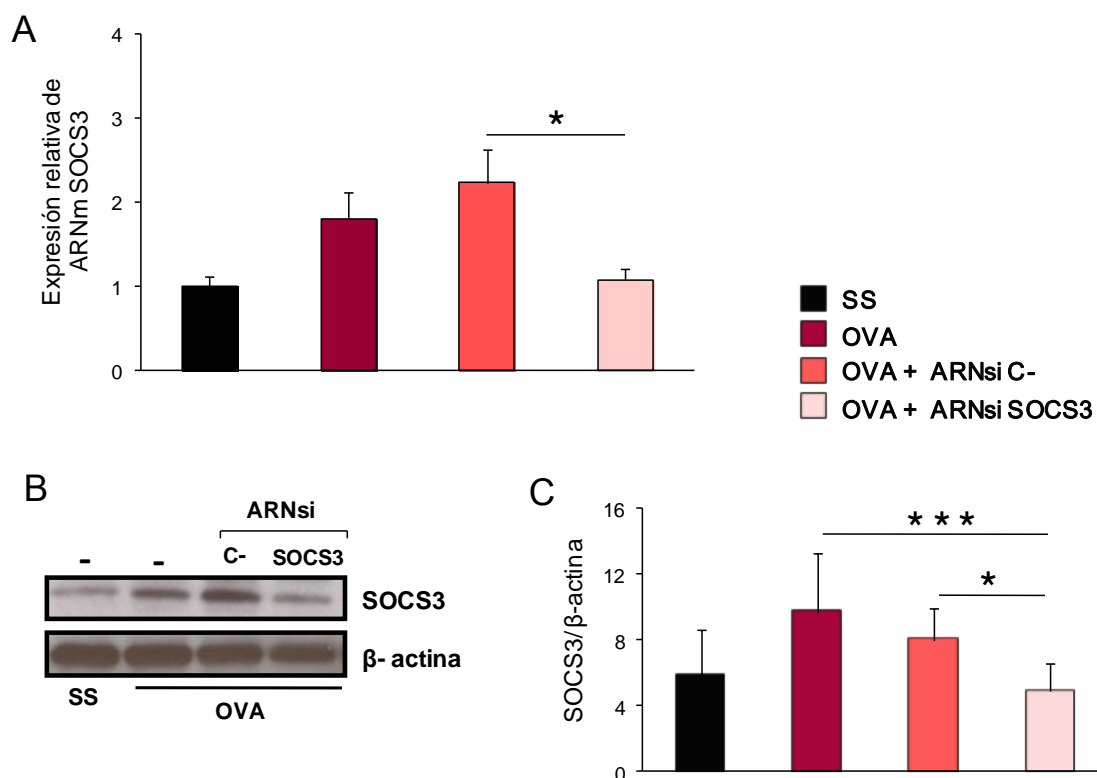


Figura 40. Expresión de SOCS3 en pulmón de los cuatro grupos del modelo de asma crónica. A. Niveles de ARNm de SOCS3 determinados por PCR cuantitativa. Se observa una disminución de la expresión génica de SOCS3 en el grupo OVA ARNsi SOCS3, $\star P<0.05$. B. Western blot de SOCS3 de los diferentes grupos de ratones. El panel inferior, corresponde a la detección de β -actina en las mismas muestras. C. Cuantificación por densitometría de las bandas de SOCS3. Se observan una reducción de la expresión estadísticamente significativa en el grupo OVA ARNsi SOCS3 en comparación con el grupo OVA y OVA ARNsi C- ($\star\star\star P<0,001$ y $\star P<0,05$, respectivamente). Los valores se expresan como media \pm DE.

Además, tanto los niveles de ARNm (Figura 40.A) como de proteína (Figura 40.B y C) de SOCS3 del grupo de ratones que habían recibido la terapia silente presentaron niveles muy similares a los del grupo control salino, indicando un restablecimiento de la abundancia natural de SOCS3.

Una vez comprobada la reducción de la expresión de SOCS3 en las vías respiratorias, se quiso determinar si el silenciamiento de este gen afectaba a SOCS1, otro miembro de la misma familia de supresores de la señalización de citocinas con que SOCS3 comparte un alto grado de homología de secuencia (Figura 41).

Los niveles de ARN mensajero de SOCS1 de pulmones procedentes de cada grupo de experimentación, no sufrieron ninguna modificación significativa, como se observa en la figura 41, confirmando así la especificidad de la terapia de silenciamiento.

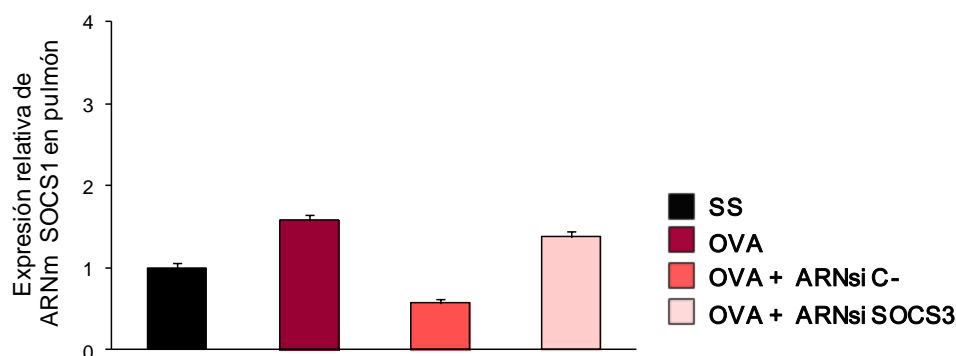


Figura 41. Análisis de la expresión de SOCS1 en pulmón tras el silenciamiento de SOCS3 en el modelo animal de asma crónica mediante PCR cuantitativa. Los niveles de ARNm de SOCS1 en pulmón obtenidos se expresan como media \pm DE y representan la expresión génica relativa determinada por el método del $\Delta\Delta C_T$ de cada grupo de experimentación. No existen diferencias significativas.

Para evaluar si la terapia de silenciamiento tenía un alcance exclusivamente en la región pulmonar o si ejercía su efecto a nivel sistémico, se evaluó si la expresión de SOCS3 se había alterado significativamente en otros órganos. Se realizaron PCRs cuantitativas de este supresor en hígado y bazo. Como se muestra en las figuras 42. A y B, la expresión génica de SOCS3 no experimentó cambios relevantes en ninguno de estos dos órganos estudiados y además, era menor que la observada en los pulmones.

RESULTADOS

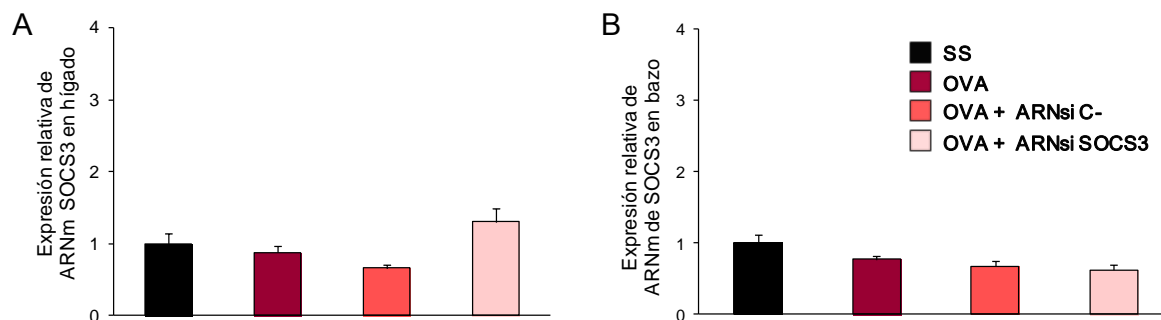


Figura 42. Determinación de la expresión de SOCS3 en otros órganos tras la terapia de silenciamiento génico por PCR cuantitativa. Niveles de ARNm de SOCS3 en hígado (A) y bazo (B). Los valores se expresan como media \pm DE y representan la expresión génica relativa determinada por el método del $\Delta\Delta C_T$ de cada grupo de experimentación. No existen diferencias significativas en ningún caso.

4.3.3. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE SOCS3 EN LA FUNCIÓN PULMONAR

El estudio de la función pulmonar se realizó 24 horas antes del sacrificio animal y por tanto, de la finalización del modelo mediante pletismografía.

El sistema de pletismografía corporal total sirve para medir la hiperrespuesta de las vías aéreas. El parámetro "Penh", mide los cambios de presión pulmonar en las vías respiratorias del ratón tras la administración de dosis crecientes de metacolina, que a su vez refleja el grado de obstrucción de la vía respiratoria del animal. Este parámetro es uno de los indicadores de la existencia de la enfermedad asmática y se correlaciona con la gravedad de la misma.

Los datos representados en la figura 43, indican que los ratones que habían recibido el ARNsi de SOCS3, presentan valores de hiperreactividad bronquial significativamente reducidos, muy similares a los valores normales reflejados en el grupo control negativo (grupo SS), en comparación con los ratones del grupo OVA y los que reciben el ARNsi inespecífico (OVA/OVA ARNsi C- versus OVA ARNsi SOCS3, $P < 0,05$ para las dosis de metacolina de 6, 12 y 24 mg/ml).

Estos resultados apuntan a un efecto protector del silenciamiento de SOCS3 en los pulmones de los ratones tratados, frente a las alteraciones funcionales que se producen como consecuencia de la exposición crónica al antígeno (OVA).

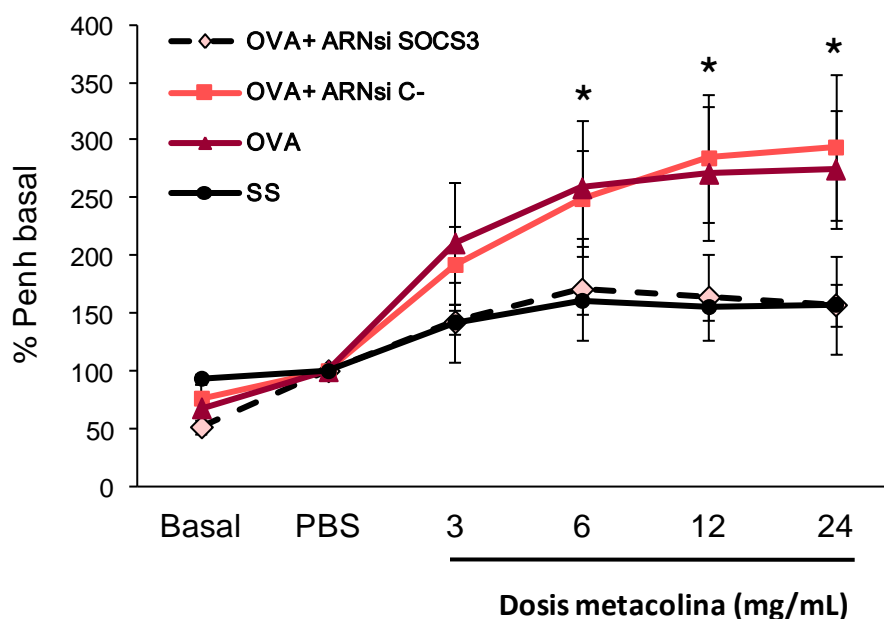


Figura 43. Hiperrespuesta bronquial a metacolina. Los ratones que recibieron la terapia con el ARNsi de SOCS3 desarrollan una respuesta a metacolina menor que los tratados con la secuencia aleatoria de ARNsi o los asmáticos no tratados. Los valores se expresan como media \pm DE en cada una de las diferentes concentraciones de metacolina. (* $P < 0,05$)

4.3.4. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA PULMONAR POR TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

La técnica de tomografía computarizada (TC) permite visualizar *in vivo* áreas en las que aumenta o disminuye el coeficiente de atenuación del haz de rayos, medido como Unidades Hounsfield (UH). Las UH por lo tanto aportan una idea de la densidad de la región analizada. En el asma, una de las características principales es la elevada secreción de moco, por parte de las células caliciformes, que se va a acumular en las vías respiratorias produciendo obstrucción.

Se obtuvieron imágenes de TC de cuatro ratones de cada grupo de estudio. En la figura 44, aparece una imagen representativa de un ratón de cada grupo. Se detectó un aumento de UH en los grupos OVA y OVA ARNsi C-, representado por un incremento de las áreas blanquecinas como se señala con flechas blancas en las imágenes 2 y 3. Dicho aumento de densidad es debido principalmente a la presencia de fluidos como el moco, que van a reducir el espacio aéreo pulmonar. En cambio, en los ratones tratados con el ARNsi de SOCS3 las UH se redujeron 2,7 veces en comparación con los grupos OVA y OVA tratado con el ARNsi control negativo.

RESULTADOS

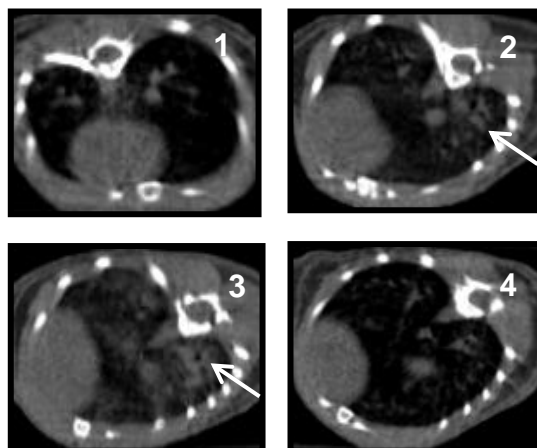


Figura 44. Tomografía computarizada de pulmón. Imágenes de micro-TC en posición axial de un pulmón representativo de cada grupo de experimentación (n=4/grupo). Las zonas hiperdensas (señaladas con flecha) corresponden a tejido con mayor presencia de fluidos. 1: SS; 2: OVA; 3: OVA ARNsi C-; 4: OVA ARNsi SOCS3.

4.3.5. VISUALIZACIÓN DE LA INFLAMACIÓN PULMONAR POR TOMOGRAFÍA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR

La inyección intravenosa del agente ProSense 680 nm permite detectar inflamación pulmonar gracias a la liberación de catepsinas al espacio extracelular que cortan y activan la fluorescencia de la sonda. Las imágenes tridimensionales obtenidas con el tomógrafo de fluorescencia molecular de los ratones del grupo OVA, y las del grupo OVA que recibían el ARNsi C- (Figura 45.A), presentan un patrón de expresión de fluorescencia en pulmón, representada en color azul, muy similar.

En cambio, en los ratones tratados con el ARNsi de SOCS3 se detectó menos fluorescencia en la región pulmonar indicando una disminución de la inflamación en los pulmones.

La cantidad de fluorescencia detectada de la sonda ProSense 680 se duplica en los pulmones de los ratones OVA y los OVA sin tratamiento de silenciamiento específico (174 ± 10 y 187 ± 26 pmol/pulmón, respectivamente), en comparación con los ratones del grupo salino (76 ± 41 pmol/pulmón, $P < 0,05$).

El silenciamiento de SOCS3 en los ratones asmáticos dio lugar a una reducción de la cantidad de agente fluorescente activable por proteasas, en relación con el detectado en los otros dos grupos de asma crónica (106 ± 13 pmol/pulmón, $P < 0,01$, figura 45.B).

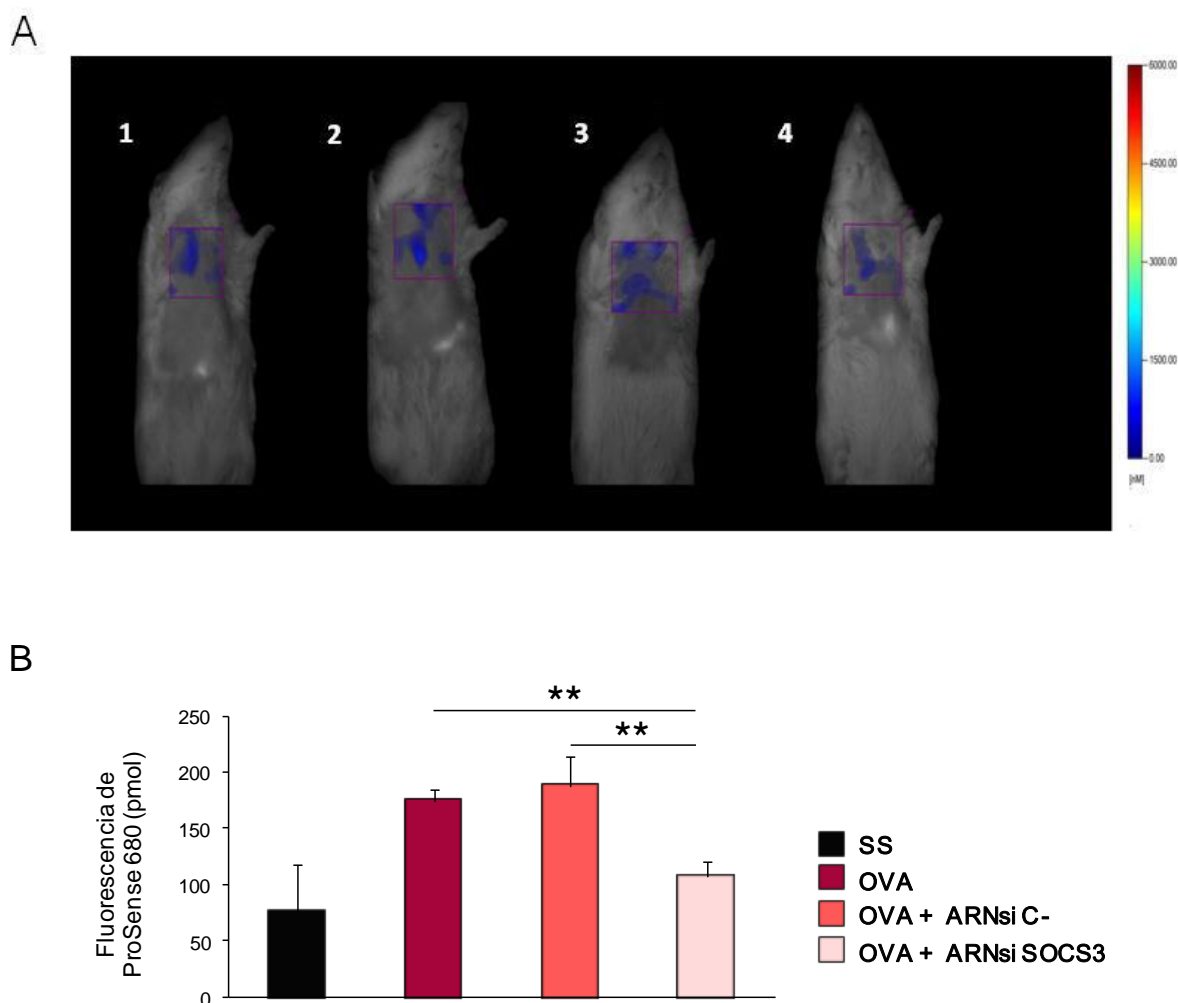


Figura 45. Medida de la inflamación por tomografía molecular de fluorescencia. A. Imágenes representativas de un ratón de cada grupo de experimentación: 1, SS; 2, OVA; 3, OVA+ ARNsi C-; 4, OVA+ ARNsi SOCS3 obtenidas por TMF tridimensional (la región de interés aparece recuadrada). B. Cuantificación de la inflamación pulmonar por TMF tridimensional, expresada como picomoles totales \pm DE de la sonda fluorescente ProSense 680 dentro de cada región pulmonar dibujada, en 4 ratones de cada grupo de estudio (** $P < 0,01$).

4.3.6. REDUCCIÓN DEL INFILTRADO CELULAR INFLAMATORIO EN LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES

Una de las características principales al inducir la sensibilización en las vías aéreas con OVA, es el aumento del infiltrado celular inflamatorio en el parénquima pulmonar. Con el propósito de analizar el efecto de la administración de la terapia de silenciamiento de SOCS3, en el contexto de la infiltración celular en el tejido pulmonar, se realizó el recuento del número de células totales en los lavados broncoalveolares (LBAs) y posteriormente, se analizaron las poblaciones leucocitarias por citometría de flujo (Figura 46).

RESULTADOS

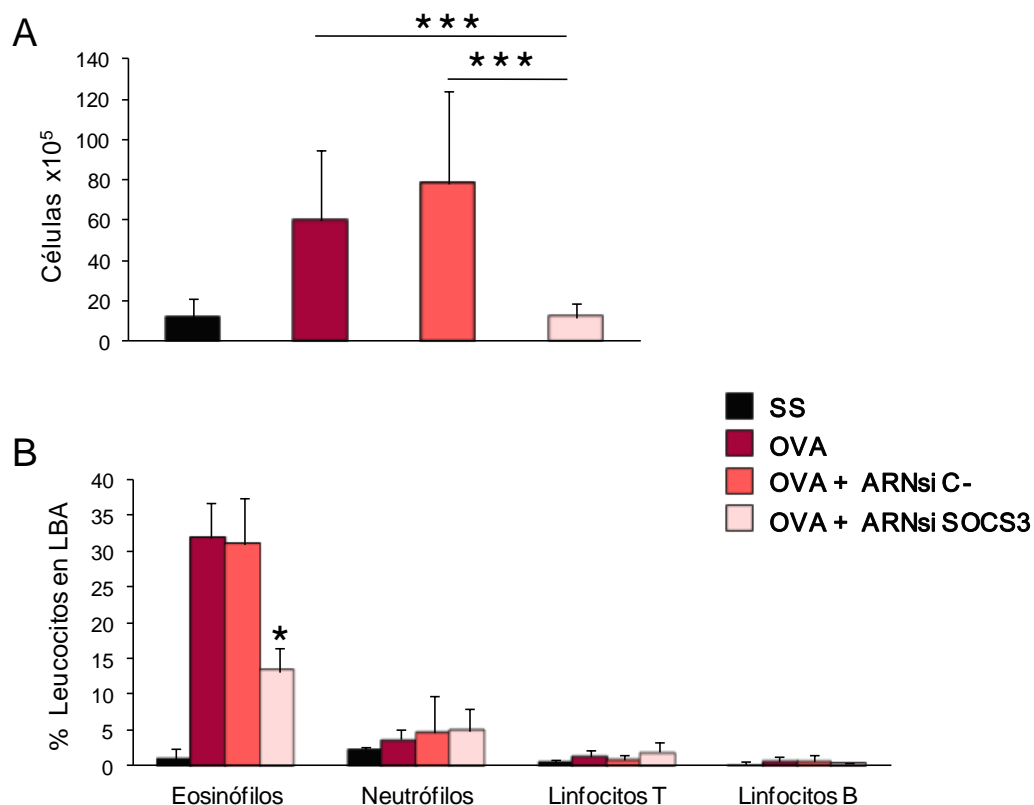


Figura 46. Cantidad de células totales y porcentajes de subpoblaciones leucocitarias en los lavados broncoalveolares (LBAs)
A. Contajes totales de células en LBA. B. Análisis de subpoblaciones leucocitarias por citometría de flujo. Los valores se representan como media \pm D.E. (*** $P < 0,001$, * $P < 0,05$).

Como se observa en la figura 46.A, el tratamiento con ARNsi de SOCS3 reduce significativamente el número total de células presente en los LBAs ($11,8 \times 10^5 \pm 7,1$ células), en comparación con los ratones sensibilizados a OVA y los OVA ARNsi C- ($59,6 \times 10^5 \pm 35,1$ y $77,8 \times 10^5 \pm 46,2$ células respectivamente, $P < 0,001$). Es más, la cantidad total de células en los LBAs de los ratones que habían recibido la terapia de silenciamiento génico de SOCS3 era prácticamente igual a la obtenida en los LBAs del grupo control de ratones ($11,8 \times 10^5 \pm 7,1$ vs $11 \times 10^5 \pm 9,5$ células, respectivamente).

El análisis del porcentaje de las subpoblaciones leucocitarias por citometría de flujo se muestra en la figura 46.B. La administración del ARNsi de SOCS3 altera el perfil celular, dando lugar a un reducción significativa (41 % disminución) de los eosinófilos en el fluido broncoalveolar ($P < 0,05$). En las restantes poblaciones leucocitarias estudiadas (neutrófilos, linfocitos T y linfocitos B), no se detectó ningún cambio significativo entre los diferentes grupos que conforman el estudio.

Estos resultados indican que, en el lavado broncoalveolar, la terapia de silenciamiento de SOCS3 reduce el infiltrado celular, constituido fundamentalmente por eosinófilos.

4.3.7. EXAMEN HISTOPATOLÓGICO EN LOS PULMONES DE LOS RATONES

4.3.7.1. Infiltrado inflamatorio

Con objeto de conocer el entramado inflamatorio y su localización pulmonar, así como el daño tisular derivado de su presencia, se analizaron los cortes de tejido pulmonar mediante la tinción de hematoxilina-eosina en los distintos grupos de estudio (Figura 47).

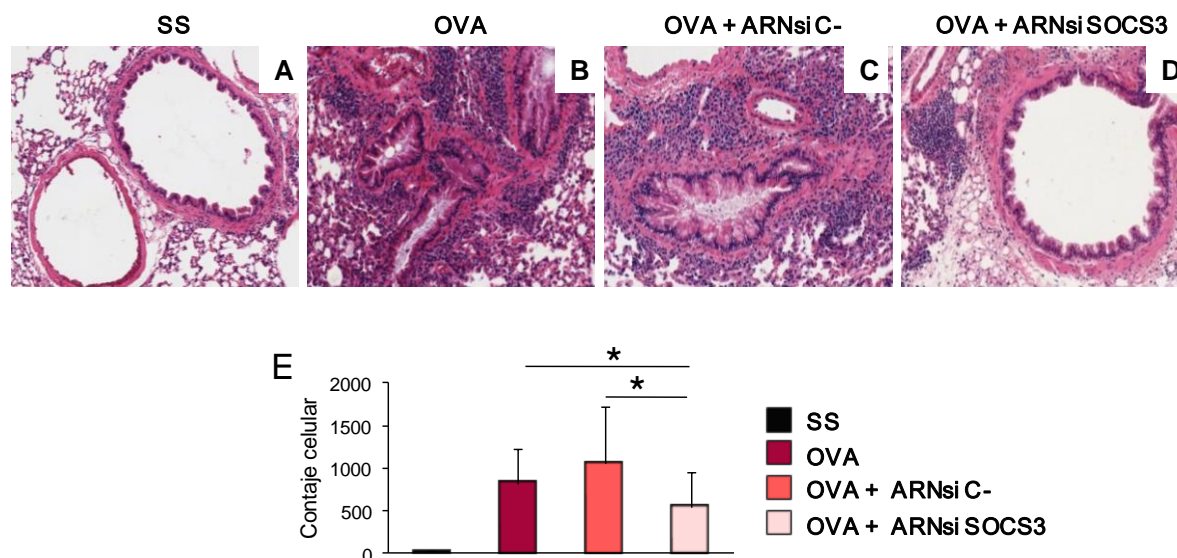


Figura 47. Análisis de la infiltración celular en el pulmón mediante tinción con HE. Se observa una gran cantidad de infiltrado celular en el parénquima pulmonar de los ratones de los grupos OVA y OVA ARNsi C- (B y C) frente a los ratones de los grupos SS y OVA ARNsi SOCS3 (A y D). E. Cuantificación de los infiltrados, se representa la media \pm D.E. (* $P < 0,05$). Aumento de imágenes x200.

Las repetidas exposiciones al alérgeno de los grupos OVA y OVA ARNsi C- dieron lugar a una elevada presencia de infiltrados inflamatorios que se localizaron principalmente en las regiones perivasculares y peribronquiales de los pulmones (Figura 47.B y C).

En cambio, en los ratones del grupo tratado con el ARNsi de SOCS3, la presencia de infiltrados se ve reducida un 52 y un 34% en comparación con los grupos OVA ARNsi control negativo y OVA, respectivamente ($P < 0,05$, figura 47.E), según la cuantificación semiautomática llevada a cabo con el programa Image J.

En el grupo control negativo (grupo SS) no se observaron células infiltradas en ninguna de las regiones analizadas.

RESULTADOS

4.3.7.2. Fibrosis pulmonar

El proceso de remodelado, es generado por una excesiva reparación de las vías respiratorias tras repetidos ataques asmáticos, aumentándose los depósitos de proteínas de la matriz extracelular (MEC), principalmente colágeno, en la membrana basal reticular y en la submucosa bronquial.

La tinción tricómica de Masson permite visualizar en color azul-verdoso, los depósitos subepiteliales de proteínas de la matriz extracelular, principalmente de colágeno.

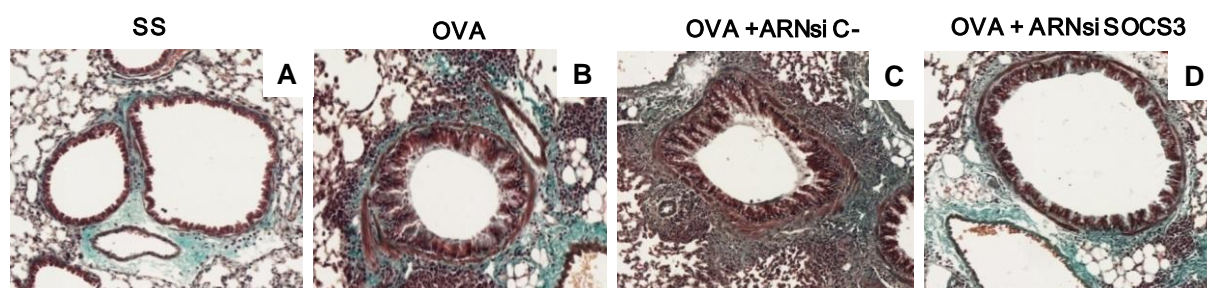


Figura 48. Tinción de cortes histológicos con la técnica Tricrómica de Masson. La presencia de depósitos subepiteliales de proteínas (color verde) es abundante en el tejido pulmonar de los ratones de los grupos OVA y OVA ARNsi C- (paneles B y C). Estos depósitos aparecen reducidos en el grupo OVA ARNsi SOCS3 (D) y en los ratones SS (A). Aumento de imágenes x200.

La presencia de depósitos de proteínas de matriz se redujo en el grupo de ratones que habían recibido el tratamiento con el ARN silente de SOCS3, como se muestra en la figura 48.D, asemejándose a la arquitectura bronquial correspondiente al grupo de ratones sanos (Figura 48.A). En la histología pulmonar de estos dos grupos, se aprecia una delgada y conservada red de fibras elásticas con función estructural y de sostén, con capacidad de provocar la retracción elástica del pulmón en la espiración.

En cambio, en los cortes histológicos pulmonares de los grupos OVA y OVA ARNsi C-, se pone de manifiesto un engrosamiento del tejido conectivo bronquial y de las regiones perivasculares como consecuencia de la cronificación de proceso asmático, como se observa en las imágenes B y C de la figura 48, respectivamente.

4.3.7.3. Producción de moco

El remodelado pulmonar tiene lugar a medida que la enfermedad asmática se cronifica. Una de las características evaluables durante este proceso es la hiperplasia y la hipersecreción de las células productoras de moco en el pulmón. Estas células caliciformes que forman parte del epitelio bronquiolar y de las glándulas presentes en el tejido conectivo de los bronquios, secretan moco que se localiza con la tinción PAS/Alcian Blue (Figura 49).

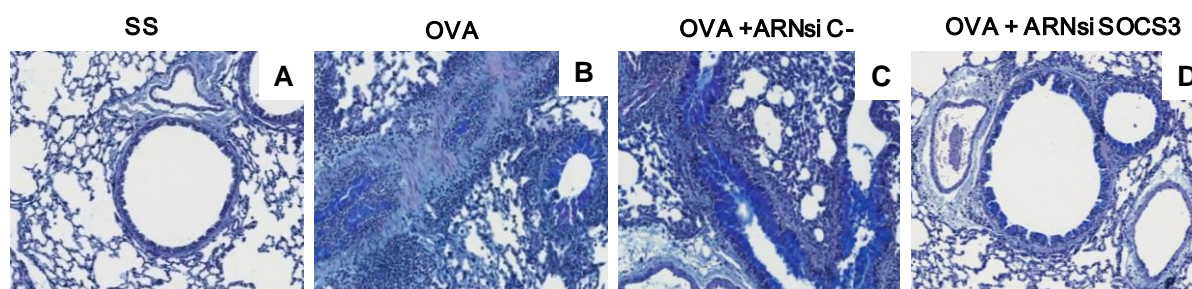


Figura 49. Producción de moco e hiperplasia de las células mucosas en las vías aéreas mediante la tinción PAS/Alcian Blue. En los ratones tratados con el ARNsi de SOCS3 no se observa prácticamente ninguna célula PAS positiva (D), igual que en el grupo SS (A). En cambio, en los grupos OVA y OVA ARNsi C- (B y C) presentan gran cantidad de células productoras de moco. Aumento de las imágenes x200.

Las imágenes indican un aumento de las células mucosas, PAS positivas en azul oscuro, en los cortes histológicos de los ratones asmáticos no tratados y los que han recibido el ARNsi C- (Figuras 49.B y C).

En cambio, en los ratones tratados con el ARNsi de SOCS3 (Figura 49.D), se observa escasa secreción mucosa y ausencia de hiperplasia celular o engrosamiento epitelial, mostrando un aspecto morfológico similar al de los pulmones de los ratones del grupo SS (Figura 49.A).

4.3.8. LA RESPUESTA HUMORAL NO SE ALTERA EN LOS RATONES CON ASMA CRÓNICA TRAS RECIBIR EL TRATAMIENTO CON ARNsi DE SOCS3

Con el fin de analizar si la terapia de silenciamiento de SOCS3 ejerce alguna modificación en los niveles de IgE total e IgE específica frente al alérgeno se valoró, mediante la técnica de ELISA, la IgE de los sueros de los distintos grupos de ratones (Tabla 11).

Los ratones de los diferentes grupos sensibilizados a OVA tenían elevados los niveles de IgE total, cuyos niveles no se modificaron tras la terapia, como se observa en la tabla 11. En cambio, la medida de la IgE específica frente al antígeno OVA fue menor en el grupo que recibió el tratamiento con el ARNsi de SOCS3 ($0,08 \pm 0,07$) en comparación con los otros dos grupos sensibilizados a OVA (OVA: $0,12 \pm 0,1$ y OVA ARNsi C-: $0,18 \pm 0,13$) aunque la diferencia no es estadísticamente significativa.

Los niveles detectados tanto de IgE total como específica frente al antígeno en el grupo control negativo (grupo SS), son inferiores con respecto a los del resto de los grupos de estudio. Este resultado es debido a que este grupo no recibió inmunización.

RESULTADOS

IgE específica OVA (DO)¹

| | IgG1 | IgG2 | IgE | IgE total (ng/ml) |
|-------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------------|
| SS | 0,05 ± 0,04 ² | 0,05 ± 0,03 | 0,06 ± 0,02 | 60,2 ± 67,1 |
| OVA | 0,41 ± 0,16 | 0,34 ± 0,22 | 0,12 ± 0,1 | 130 ± 25,6 |
| OVA + ARNsi C- | 0,49 ± 0,24 | 0,26 ± 0,24 | 0,18 ± 0,13 | 156,1 ± 58,5 |
| OVA + ARNsi SOCS3 | 0,51 ± 0,28 | 0,32 ± 0,28 | 0,08 ± 0,07 | 150,3 ± 3,3 |

Tabla 11. Determinación de la IgE total y de las inmunoglobulinas IgE, IgG₁ e IgG₂ específicas frente a ovalbúmina en el suero de los ratones. ¹Valores de Ig representados como media ± DE de los diferentes grupos de ratones; ²P<0,05 del grupo SS respecto a los grupos OVA, OVA ARNsi C- y OVA ARNsi SOCS3.

También se midió la producción de IgG₁ e IgG₂ específicas frente al antígeno OVA, que no varió entre los diferentes grupos de estudio (Tabla 11). De todo ello se deduce que el tratamiento con ARNsi de SOCS3, no altera significativamente la respuesta humoral generada frente a la ovalbúmina.

4.3.9. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE SOCS3 EN EL PERFIL DE EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN EL PULMÓN

La respuesta alérgica es orquestada, en parte, por las citocinas inflamatorias que liberan las células activadas en las vías aéreas. Por ello, se analizaron los niveles de citocinas en los pulmones de los ratones de los diferentes grupos de estudio, mediante PCR cuantitativa.

Como se observa en la figura 50, los niveles de ARNm de IL-4, IL-5 e IL-13, todas ellas citocinas Th2, se encontraron elevados en el grupo de ratones a los que se les indujo asma ($P<0,05$, Figura 50.A, B y C).

La administración del ARNsi de SOCS3 ocasionó una disminución significativa de los niveles del ARNm de estas tres citocinas, en comparación con los niveles alcanzados en los grupos sensibilizados a OVA sin recibir la terapia específica de silenciamiento génico (Figura 50.A, B y C, $P<0,05$). En general se obtuvo una reducción de 15 veces menos de expresión relativa de ARNm en el grupo OVA ARNsi de SOCS3 en comparación con los otros dos grupos OVA para cualquiera de las tres citocinas medidas, con excepción de los grupos OVA ARNsi C- y OVA, en los cuales, los niveles de IL-13 e IL-5 respectivamente, fueron inferiores.

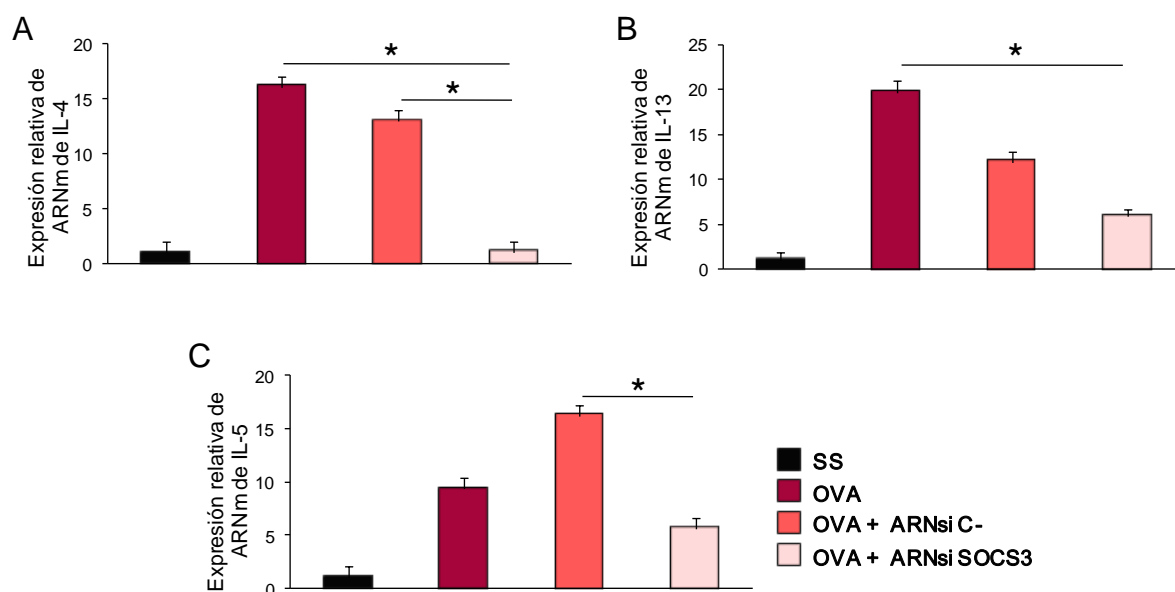


Figura 50. Efecto de la terapia con ARNsi de SOCS3 en la expresión génica de citocinas Th2 en pulmón de ratones con asma crónica inducida. Los niveles de expresión de ARNm de IL-4 (A), IL-13 (B) e IL-5 (C), se midieron por PCR cuantitativa. Los resultados muestran la expresión génica relativa representados como la media de cada grupo \pm DE. (* $P < 0.05$).

El $\text{IFN}\gamma$ es otro de los factores implicados en la enfermedad asmática que participa en la regulación del eje Th1/Th2. Los niveles de ARNm de $\text{IFN}\gamma$ en pulmón se encontraron elevados en todos los grupos sensibilizados a OVA, sin importar el tratamiento recibido, en comparación con el grupo salino (Figura 51).

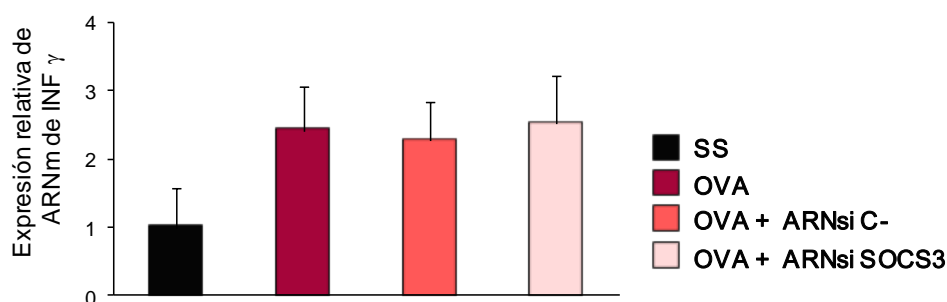


Figura 51. Efecto de la terapia con ARNsi de SOCS3 en la expresión génica de $\text{IFN}\gamma$ en pulmón de ratones con asma crónica inducida. Los niveles de expresión de ARNm de $\text{IFN}\gamma$ se midieron por PCR cuantitativa. Los resultados muestran la expresión génica relativa representados como la media de cada grupo \pm DE.

Por último, se evaluó si el tratamiento con el ARN de silenciamiento modificaba el eje regulador. Se midieron por tanto, dos de las citocinas más características que conforman dicho eje: IL-10 e IL-17A (Figura 52).

RESULTADOS

En el grupo de ratones tratados con el ARNsi de SOCS3, la expresión génica de IL-10, se incrementó hasta 10 veces más en comparación con el grupo OVA como se observa en la figura 52.A ($P<0,05$). En los ratones que recibieron el ARNsi control negativo, los niveles de ARNm de IL-10 también fueron elevados, pero no alcanzaron valores significativos con el grupo OVA.

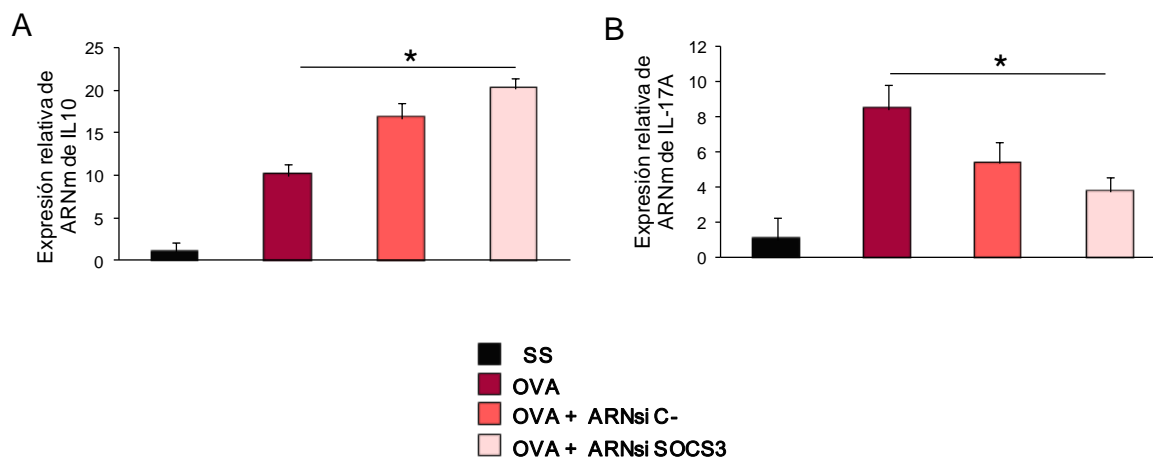


Figura 52. Efecto de la terapia con ARNsi de SOCS3 en la expresión génica de citocinas reguladoras en pulmón de ratones con asma crónica inducida. Los niveles de expresión de ARNm IL-10 (A) y IL-17A (B), se midieron por PCR cuantitativa. Los resultados muestran la expresión génica relativa representados como la media de cada grupo \pm D.E. (* $P<0.05$).

En cambio, los niveles de ARNm de IL-17A mostraron un comportamiento antagónico a los de IL-10. En los ratones que habían recibido la terapia con el ARNsi de SOCS3, la expresión génica de IL-17A se redujo en comparación con el grupo OVA (Figura 52.B $P<0,05$) que presentaban unos niveles de expresión, 10 veces superiores a los del grupo salino. En el caso del grupo de ratones tratados con el ARNsi C-, la expresión de IL-17A fue similar a la de los ratones con el silenciamiento de SOCS3, sin alcanzar diferencias significativas entre ambos grupos.

En resumen, la expresión génica de las citocinas IL-5, IL-13, IL-4 e IL-17A se encuentra disminuida en los pulmones de los ratones a los que se les administró el ARNsi de SOCS3, mientras que los niveles de la citocina IL-10 están aumentados.

4.3.10. EL TRATAMIENTO CON ARNsi DE SOCS3 INHIBE LA FOSFORILACIÓN DE STAT3

La ruta de señalización JAK-STAT se encuentra activada en exceso en el asma crónica, debido a la gran concentración de citocinas y factores inflamatorios y a la desregulación de la expresión de SOCS3 en esta enfermedad. Por ello, se midió el estado de fosforilación de STAT3, uno de los componentes de la ruta, en los pulmones de los ratones de los diferentes grupos, mediante la técnica de western blot (Figura 53).

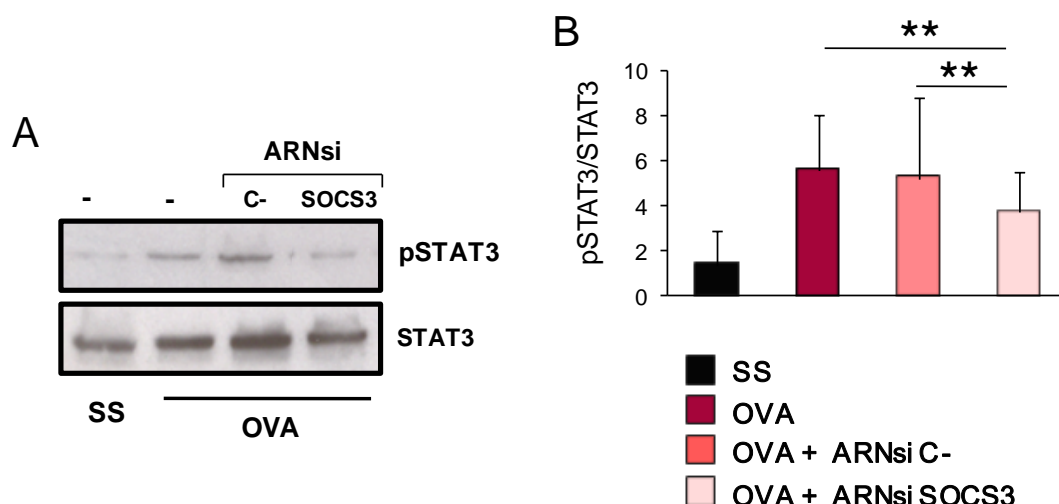


Figura 53. Evaluación del estado de fosforilación de STAT3 en el modelo de asma crónica. A. Western blot representativo de fosfo-STAT3 y STAT3 de lisados de pulmón de un ratón de cada grupo de experimentación. B. La expresión de fosfo-STAT3 fue normalizada con la expresión total de STAT3 y cuantificada por densitometría, las barras representan la media de cada grupo \pm D.E. (** $P < 0.01$).

Como se observa en la figura 53.A, la fosforilación de STAT3 está aumentada en los pulmones de los ratones de los grupos OVA y OVA que recibieron el ARNsi control negativo. En cambio, en los ratones tratados con el ARNsi de SOCS3, la banda perteneciente a la proteína STAT3 fosforilada se encuentra muy atenuada, mientras que en el grupo de ratones control (SS) es casi inexistente.

La densitometría de las bandas proteicas (Figura 53.B), corroboró los datos visuales, estableciendo diferencias significativas entre los grupos asmáticos OVA y OVA ARNsi C-, y el grupo OVA ARNsi de SOCS3 ($P < 0.001$).

4.3.11. LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA RHOA/RHO KINASA SE MODIFICA TRAS LA TERAPIA CON ARNsi DE SOCS3

La vía de RhoA/Rho-kinasa está directamente implicada en asma, promoviendo broncoconstricción, remodelado de las vías aéreas e inflamación pulmonar. En el modelo animal, la expresión proteica de RhoA y la isoforma enzimática ROCK-2 se incrementaron en los grupos de ratones OVA y OVA ARNsi C- (Figura 54.A).

De la misma manera, la expresión de estos dos componentes de la vía se vio reducida en el grupo de ratones que habían recibido la terapia con ARN silente de SOCS3.

Los niveles de expresión proteicos fueron normalizados frente a la expresión de β -actina y densitometrados para su cuantificación, como se muestra en las figuras 54.B y C.

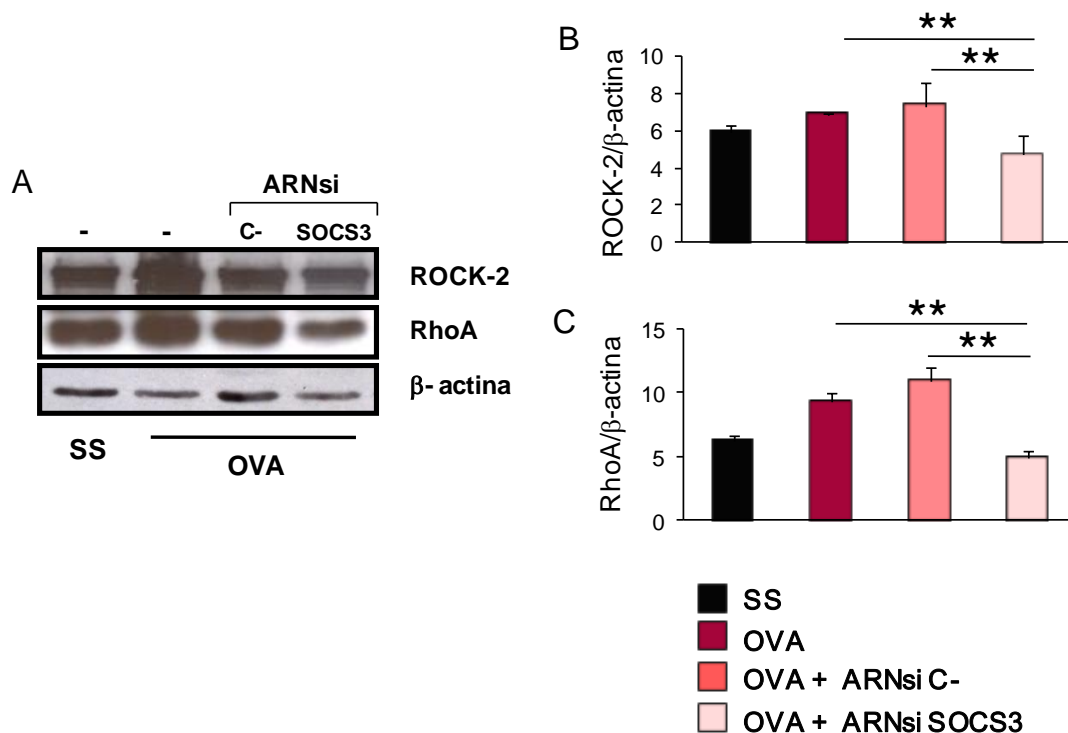


Figura 54. Análisis de la vía de señalización de la RhoA-ROCK en el modelo de asma crónica. A. Western blot de ROCK-2, RhoA y β-actina de lisados de pulmón de un ratón representativo de cada grupo. Cuantificación por densitometría de la expresión proteica de ROCK-2 (B) y RhoA (C). Las barras representan la media de cada grupo ±D.E. (** $P < 0.01$).

4.3.12. MODIFICACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE MICRO ARNs EN PULMÓN TRAS EL SILENCIAMIENTO DE SOCS3

Los micro ARN (ARNmi) participan activamente en la regulación de la expresión génica. La manifestación de cualquiera de los fenotipos asmáticos necesita de una compleja interacción entre la predisposición genética y múltiples factores ambientales posiblemente regulada principalmente por la epigenética. Los ARNmi, gracias a su capacidad de activar diversos factores de transcripción, son uno de los mecanismos epigenéticos más importantes ya que participan activamente en la regulación de la expresión génica.

Por lo tanto, se quiso evaluar mediante la técnica de microarray si el tratamiento con ARNsi de SOCS3, producía una variación en la expresión de los microARNs en los pulmones de los ratones sensibilizados a OVA.

El análisis del perfil de expresión de ARNmi en el modelo de asma alérgica crónica como consecuencia del silenciamiento de SOCS3 en los pulmones generó una lista de determinados ARNmi alterados por la terapia.

En la tabla 12 se muestran los ARNmi cuya expresión se encontró alterada tras la terapia de silenciamiento de SOCS3. Los grupos OVA y OVA ARNsi C- se unificaron en un mismo grupo para facilitar el análisis.

Un total de 25 microARN disminuyeron su expresión en el grupo de ratones que habían recibido la terapia con ARNsi de SOCS3 (tabla 12, *primera columna*), mientras que 11 microARN aumentaron su expresión tras el tratamiento en comparación con el grupo que no había recibido terapia efectiva (tabla 12, *segunda columna*).

| DISMINUCIÓN ^a | | AUMENTO ^b | |
|--------------------------|------|----------------------|------|
| ARNmi | INV | ARNmi | INV |
| miR-17 | 2,15 | miR-466g | 0,45 |
| miR-674 | 2,04 | miR-1935 | 0,46 |
| miR-25 | 2,07 | miR-1247 | 0,27 |
| miR-195 | 2,92 | miR-705 | 0,43 |
| miR-497 | 2,04 | miR-5107 | 0,47 |
| miR-199b | 2,4 | miR-3104 | 0,47 |
| miR-146b | 2,53 | miR-1224 | 0,48 |
| miR-1839 | 2,23 | miR-130a | 0,38 |
| miR-122 | 3,1 | miR-1949 | 0,42 |
| miR-106b | 2,66 | miR-200b | 0,49 |
| miR-152 | 2,59 | miR-1247 | 0,46 |
| miR-10a | 3,04 | | |
| miR-199a | 5,8 | | |
| miR-200a | 2,1 | | |
| miR-30B | 2,81 | | |
| miR-199a1 | 2,95 | | |
| miR-126 | 2,26 | | |
| miR-182 | 2,2 | | |
| miR-184 | 2,37 | | |
| miR-181c | 3,32 | | |
| miR let-7d-star | 2,74 | | |
| miR-1964 | 2,11 | | |
| miR-665 | 2,68 | | |
| miR-3098 | 2,25 | | |
| miR-671 | 2,14 | | |

Tabla 12. Lista de ARNmi modulados significativamente tras la terapia con ARNsi de SOCS3 en comparación con los grupos de ratones asmáticos no-tratados ($P<0,05$), y su respectiva inducción expresada en número de veces (INV).

^aARNmi disminuídos en el grupo tratado con ARNsi de SOCS3 en comparación con los no-tratados.

^bARNmi aumentados en el grupo tratado con ARNsi de SOCS3 en comparación con los no-tratados.

DISCUSIÓN

El asma es una enfermedad cuya prevalencia y morbilidad aumentan cada año en los países industrializados, siendo su variabilidad una de sus señas de identidad más importantes [79]. Presenta una patogénesis extraordinariamente compleja y la clasificación de los pacientes dentro de uno de los múltiples subfenotipos establecidos [213] no siempre es sencilla, lo origina en muchas ocasiones respuestas impredecibles a los tratamientos. Además, las terapias existentes disponibles hoy en día, están diseñadas principalmente para aliviar los síntomas, y controlar de este modo la enfermedad, previniendo en lo posible, el deterioro de la función pulmonar y el remodelado de las vías respiratorias. Estos tratamientos en ningún caso abordan la modificación de la respuesta inmune que en ella se produce.

Dentro de los fenotipos asmáticos el más común es el de tipo Th2, caracterizado principalmente por presentar un componente alérgico y la presencia mayoritaria de eosinófilos en los infiltrados inflamatorios de las vías respiratorias, a medida que se cronifica la enfermedad [214]. Dado que el supresor de la señalización de citocinas 3 (SOCS3) participa activamente en la polarización de la respuesta inmune Th2 [215] y consecuentemente en el desarrollo y mantenimiento de este fenotipo asmático, en la presente tesis se ha analizado la expresión y regulación de este supresor con la intención de perfilar una nueva diana terapéutica para el tratamiento del asma alérgica. Además, se ha analizado la expresión de SOCS3 en la bronquitis eosinofílica-no asmática y la esofagitis eosinofílica, otras dos enfermedades típicas Th2, en las que su regulación también debería ser considerada para el control y remisión de las mismas.

El estudio ha sido acometido en cinco fases bien definidas:

1. Búsqueda de la molécula candidata susceptible a erigirse como posible diana terapéutica para el tratamiento del asma alérgica mediante el análisis del perfil de expresión génica en pulmones de ratones con asma alérgica crónica y ratones con asma alérgica crónica tratados con galectina-3, un potente inhibidor de la IL-5. Elección y validación de la proteína SOCS3.
2. Estudio de la expresión de SOCS3 en asma y otras dos patologías Th2: bronquitis eosinofílica-no asmática y esofagitis eosinofílica. Demostración de la expresión de SOCS3 en eosinófilos humanos de sangre periférica.
3. Evaluación de la regulación de SOCS3 en eosinófilos por citocinas Th2 y PGE₂.
4. Análisis de la función de SOCS3 en los eosinófilos de pacientes asmáticos mediante su silenciamiento génico.
5. Terapia de silenciamiento génico de SOCS3 mediante administración intranasal del ARNsi en un modelo animal de asma alérgica y crónica.

5.1. SOCS3 COMO POSIBLE NUEVA DIANA EN EL TRATAMIENTO DEL ASMA Y OTRAS ENFERMEDADES TH2

La búsqueda de nuevos candidatos para el tratamiento del grupo de enfermedades caracterizadas por una polarización Th2 de la respuesta inmune, principalmente el asma, comienza con el análisis del patrón de expresión génica en pulmones de los ratones del modelo de asma crónica inducida por OVA. En un trabajo anterior, se había comprobado en este modelo, que la terapia génica con galectina-3 (Gal-3) producía una mejoría de los síntomas que acompañan a las reacciones asmáticas y evitaba la cronificación del proceso y la consecuente remodelación pulmonar al disminuir la expresión de IL-5 [209]. La Gal-3 es una lectina de tipo S no glicosilada perteneciente a la familia de proteínas que unen β -galactósidos. Presenta un dominio amino-terminal característico, una secuencia repetitiva rica en glicina y prolina, y un dominio carboxi-terminal que contiene el sitio de unión a carbohidratos. La expresión de Gal-3 es muy ubicua [216] y ha sido tradicionalmente relacionada en múltiples procesos inflamatorios, especialmente en los alérgicos [210, 217] gracias a su capacidad de interaccionar tanto con la molécula de IgE, como con los receptores de alta y baja afinidad para esta inmunoglobulina, Fc ϵ RI y Fc ϵ RII respectivamente [218, 219].

Para desentrañar y afinar el efecto beneficioso de la terapia con Gal-3 en el modelo de asma alérgica crónica, se llevó a cabo un análisis de la expresión de más de 37.000 genes en muestras de pulmones procedentes de dos grupos diferentes de ratones (asmáticos y asmáticos tratados con el plásmido que codifica para el gen de la Gal-3), mediante una técnica de expresión génica masiva como son los microarrays, a partir de ADN complementario, permitiéndolo así la identificación de genes que varían su expresión tras la terapia génica con Gal-3. La técnica de los microarrays es de uso relativamente frecuente en la actualidad para analizar genes que se expresan diferencialmente entre distintas condiciones, clasificar molecularmente enfermedades complejas, identificar genes característicos de una patología, predecir la respuesta a un determinado tratamiento o detectar nuevas mutaciones y polimorfismos de un único gen. Centrando la atención en la patología asmática, uno de los trabajos más destacados que ha empleado esta herramienta de biología molecular, es el llevado a cabo por Moffatt y colaboradores dentro del programa GABRIEL, en el que se identificaron numerosos genes de susceptibilidad entre los que se encuentran IL18R1, IL33, SMAD3, ORMLD3, HLA-DQ y IL2RB, [91].

El análisis del transcriptoma a nivel pulmonar en ratones con asma crónica que se realiza en la presente tesis está en la misma línea de investigación, en este caso, con el objetivo de obtener un panel de genes directamente implicados en el desarrollo de la enfermedad asmática modificados por la terapia génica con Gal-3, y de este modo, avanzar en la caracterización de las moléculas implicadas en la enfermedad asmática. De forma que al compararse el perfil de expresión génica de los ratones asmáticos (OVA), con el de los ratones con asma que habían recibido el tratamiento con Gal-3, se consiguió lo que se denomina una “firma” de expresión génica asociada a la efectividad de la terapia.

Numerosos genes relacionados con el desarrollo pulmonar, la respuesta inflamatoria y muchos procesos más, presentaron un patrón de expresión alterado entre ambas condiciones (Figura 14). El hallazgo más importante que reveló el estudio fue la incapacidad de identificar un único gen erigido por encima del resto, sino que múltiples genes asociados a diferentes vías incrementaron o disminuyeron su expresión. Esta variabilidad observada, concuerda perfectamente con la complejidad intrínseca del asma, ya que es una enfermedad multigénica y multifactorial que en ningún caso podría estar relacionada con la modificación de un único gen. Debido a la gran cantidad de información recogida en los microarrays, el establecimiento de una estrategia analítica fue fundamental para detectar de forma precisa cambios coordinados en la expresión entre grupos [208].

El análisis de la función biológica identificó muchos procesos, como la respuesta inflamatoria, la activación de leucocitos y la producción de citocinas; en todos ellos, la expresión de los genes participantes en ellos, estaban aumentados significativamente en el grupo asmático sin tratar en comparación con el tratado con la Gal-3 (Tabla 6). Una de las vías cuya expresión génica se encontraba “enriquecida” en los ratones con asma, era la implicada en la regulación negativa de la respuesta inflamatoria; en la que participan, entre otros reguladores intracelulares, los miembros de la familia de proteínas SOCS [220]. Como se ha detallado en el capítulo de introducción; las proteínas SOCS regulan negativamente la señalización de las citocinas, siendo muy importantes para el adecuado progreso, remisión y finalización de una determinada respuesta inmune.

La regulación ejercida con la terapia de Gal-3 sobre las proteínas SOCS aporta evidencias para continuar ampliando el estudio de caracterización de una nueva diana terapéutica para el tratamiento del asma, siendo el siguiente paso la confirmación de la reducción de la expresión de SOCS en los ratones tratados con la terapia génica con Gal-3. Para ello se analizaron los niveles de ARNm de SOCS1, SOCS3 y SOCS5 por PCR cuantitativa (Figura 15). La expresión génica de SOCS1 y SOCS3, pero no de SOCS5, era significativamente menor en el grupo OVA pEGFP-Gal-3 en comparación con los ratones sensibilizados a OVA sin tratar. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos en los pacientes con patologías Th2, en los que la expresión de SOCS5 no experimenta cambios significativos, ni en los eosinófilos de pacientes con asma o BENA (Figura 17), ni en el esófago de los individuos con EoE (Figura 19); mientras que los niveles de ARNm de SOCS1 y SOCS3 sí están aumentados en los pacientes con asma y EoE. En particular, el supresor de la señalización de citocinas 3 (SOCS3), se expresa de forma predominante en las células Th2, e inhibe la diferenciación a Th1 [221]. Hace unos años, varios grupos demostraron que la expresión de SOCS3 se correlaciona con la gravedad de ciertas patologías Th2 como el asma y la dermatitis [215, 222]. Dado que la terapia con Gal-3 parecía ejercer de forma directa o indirecta algún efecto en la transcripción de SOCS3, se confirmó mediante inmunohistoquímica la localización de este supresor en el tejido pulmonar (Figura 16). La expresión de SOCS3 coincidía con la acumulación de células inflamatorias a nivel peribronquial. El tratamiento con Gal-3 eliminaba, casi por completo, la presencia de células que expresaban gran cantidad de SOCS3, probablemente debido al aclarado

DISCUSIÓN

del infiltrado inflamatorio, y por tanto, de células Th2 donde principalmente se expresa este supresor.

5.2. EXPRESIÓN DE SOCS3 EN EOSINÓFILOS DE PACIENTES CON ENFERMEDADES DE TIPO Th2

En humanos, la expresión de SOCS3 en linfocitos T ha sido minuciosamente investigada [223]. Últimamente se han planteado estudios sobre su función en otras células distintas a los linfocitos T, como en macrófagos [224], células dendríticas [225] y células NKT (*Natural Killer T*) [226].

Las limitaciones intrínsecas que conlleva la experimentación con cultivos primarios de eosinófilos, puede ser la causa de la inexistencia de trabajos, hasta la fecha, que abordasen el estudio de la función de SOCS3 en eosinófilos, teniendo en cuenta la importancia de este tipo celular en las patologías Th2; por ello, se decidió investigar el mecanismo de este supresor en los eosinófilos.

5.2.1. EXPRESIÓN DE SOCS3 EN EOSINÓFILOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA

La expresión de SOCS3 en eosinófilos humanos purificados de sangre periférica ha sido analizada en sujetos sanos y pacientes con tres enfermedades Th2: asma, bronquitis eosinofílica-no asmática (BENA) y esofagitis eosinofílica (EoE).

Los experimentos iniciales realizados a partir de eosinófilos purificados de sangre periférica de humanos, (Figura 18), confirman por primera vez, la capacidad de estas células de transcribir y expresar SOCS3 tanto a nivel génico por PCR cuantitativa (Figura 17), como a nivel proteico mediante inmunocitoquímica [212].

Además, la expresión génica de SOCS3 en los eosinófilos de sangre periférica de pacientes con asma y BENA, caracterizadas ambas por la presencia de un importante infiltrado eosinofílico en las vías respiratorias, está aumentada con respecto a la detectada en los eosinófilos de los controles sanos; en el caso de los pacientes con BENA el aumento de expresión fue mayor (Figura 17).

La BENA se introdujo en el estudio puesto que comparte con el asma la presencia de infiltrados inflamatorios eosinofílicos, característicos de las respuestas Th2. A diferencia de la enfermedad asmática, la BENA no cursa con obstrucción variable al flujo ni hiperrespuesta de las vías respiratorias (Tabla 7), posiblemente por la localización epitelial de los mastocitos en la pared bronquial, mientras que en los pacientes asmáticos se encuentran infiltrados en las células de músculo liso [227]. También, hace unos años Sastre y cols. relacionaron los elevados niveles de PGE₂ en el esputo de enfermos con bronquitis eosinofílica, con la inhibición de la proliferación de la musculatura lisa, a través de los receptores EP₂ y EP₄ que activan a la enzima adenilato ciclasa encargada de la formación del AMPc, hallazgo que aportaba un nuevo mecanismo para explicar la ausencia de hiperrespuesta de las vías respiratorias [228].

En la actualidad, el diagnóstico de la BENA sigue siendo controvertido, y necesita ser confirmado con la determinación del número de eosinófilos en esputo en los casos en que las pruebas de provocación con metacolina, que corroboran la hiperreactividad bronquial, son negativas.

5.2.2. SOCS3 EN LA ESOFAGITIS EOSINOFÍLICA

Al igual que ocurre con la enfermedad asmática, la prevalencia de la EoE se incrementa cada día, y los tratamientos son apenas eficaces en los casos más graves y crónicos. En ambas, la atopia parece ser un fuerte rasgo a la hora de desarrollar la enfermedad, así como las características ambientales y el factor genético [229], por todo ello, se incluyó en el estudio con la intención de evaluar la expresión de SOCS, y en particular de SOCS3 como posible biomarcador, así como su relación con el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad.

Como se había demostrado que la expresión génica de SOCS3 era elevada en los eosinófilos de los pacientes con asma y BENA, inicialmente se midió este supresor y otros factores en muestras de sangre periférica. La determinación de moléculas en periferia resulta menos invasiva para el paciente y se obtienen resultados con relativa rapidez.

La medida de la expresión génica de SOCS3 en eosinófilos de sangre periférica de pacientes con esofagitis eosinofílica no aumentó significativamente en relación con los eosinófilos procedentes de los sujetos control. En esta enfermedad, a diferencia de las otras dos enfermedades Th2, la expresión de SOCS3 en periferia no parece modificarse, puesto que también fue analizada en células mononucleares sin obtener diferencias significativas (Figura 23). Además, la expresión de citocinas en suero tampoco presentó alteraciones destacables entre los pacientes con EoE y los controles (Figura 24). La ausencia de marcadores aumentados en sangre periférica en estos pacientes ha sido discutida en otros trabajos, entre ellos, cabe destacar el extenso análisis de citocinas, tanto en tejido esofágico como en sangre periférica, acometido por Blanchard y cols, en el que describen un perfil Th2 característico de expresión de citocinas a nivel local, pero en cambio no consiguen establecer una relación directa con los niveles de las mismas citocinas detectadas a nivel sistémico, como la IL-5 y la IL-13 [139].

En cambio cuando se analizaron los niveles de ARNm de SOCS1 y SOCS3 en las biopsias de esófago por PCR cuantitativa (Figura 19), se observó un aumento de la expresión génica de ambos y estos niveles transcripcionales de SOCS1 y SOCS3, se correlacionaron positivamente con la eosinofilia tanto esofágica como periférica en los pacientes con EoE ($r=0,41$, $P<0,05$ y $r=0,46$, $P<0,005$, respectivamente; correlación de Spearman).

Estos resultados centraron el estudio exclusivamente en el tejido diana, descartando la búsqueda de aspectos diferenciales entre los dos grupos de pacientes en sangre periférica.

En la población analizada (Tabla 8), el ratio hombres/mujeres es superior al descrito en la literatura, siendo de 9:1 en comparación con el ratio 3:1 descrito en otros estudios [230]. La mayoría de la

DISCUSIÓN

población con EoE es atópica, y más de un 80% de los pacientes sufre otra enfermedad alérgica, concordando con las descripciones hechas en otras cohortes [231].

Este hecho, confirma la clasificación de esta enfermedad como patología condicionada por un fenotipo Th2, detectándose un aumento en los niveles de ARNm en las biopsias de esófago de factores partícipes en la generación y/o mantenimiento de dicho estado, como son IL-5, IL-13, CCR3 y eotaxina-3 (Figura 20) [141, 232].

La eotaxina-3, junto con la IL-5, es uno de los genes más expresados en la EoE, y son las propias células epiteliales, la principal fuente de este quimioatrayente en el esófago. Por otro lado, la IL-5 además de regular la eosinofilia esofágica [233-235], desempeña una función esencial en el remodelado del esófago [236]. En un trabajo publicado recientemente, se obtenían los mismos resultados mediante el estudio del perfil de expresión de citocinas en los pacientes con EoE, como se ha indicado con anterioridad [139]. El marcado incremento de IL-13 obtenido (10,5 veces) en las biopsias de los sujetos con EoE, así como su localización mediante inmunohistoquímica en las zonas de inflamación (Figura 21), corrobora y sigue la línea de estudios previos en los que se destaca la importancia de esta citocina en la EoE, como es el caso del artículo publicado por Blanchard y cols. en el que detectan niveles de ARNm de IL-13 en las biopsias de esófago de los pacientes con EoE 16 veces superiores a los obtenidos en los sujetos sanos. Además, en el mismo trabajo, la estimulación de líneas celulares de esófago con IL-13 es suficiente para inducir un transcriptoma muy similar al encontrado en el esófago de los pacientes con EoE, desatacándose el aumento de expresión de eotaxina-3 [237].

En la esofagitis eosinofílica, los eosinófilos son una gran fuente de SOCS1 y SOCS3 y es posible que su expresión regule de forma directa o indirecta la patogénesis de la EoE, activando la producción de diferentes mediadores que a su vez actúan como moléculas efectoras. Esta hipótesis se sustenta en los resultados de correlación obtenidos entre la expresión de SOCS1 y SOCS3, y el resto de genes medidos (IL-5, eotaxina-3, CCR3 e IL-13) (Tabla 9). Además de mantener un fenotipo Th2, en el que las citocinas inflamatorias IL-5 e IL-13 están incrementadas, es posible que las proteínas SOCS 1 y 3 al elevarse, también estimulen a las células del esófago para inducir la secreción de quimioatrayentes, como la eotaxina-3, que a través de la señalización por la vía MAPK/ERK, recluta eosinófilos al esófago de los pacientes con EoE e induce su degranulación [238, 239]. En este sentido, se ha encontrado un aumento de la expresión de ERK, tanto a nivel transcripcional (MAPK1) como en su estado de fosforilación (p-Erk) en las biopsias de los enfermos (Figura 22). La acumulación de proteína SOCS3, ya ha sido relacionada previamente con la activación de ERK en las líneas celulares HUVEC y COS1, procedentes de cultivos de endotelio vascular y fibroblastos respectivamente, a través de un aumento del AMPc, regulado por las proteínas EPAC (*exchange proteins directly activated by cyclic AMP*) [240, 241].

Para controlar esta enfermedad crónica es común el uso de corticosteroides; además existen varios ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales anti-IL-13 y anti-IL-5 [242], centrados en la mejora de la disfunción esofágica y la depleción de eosinófilos respectivamente.

Actualmente, se están implantando protocolos que controlan la dieta en estos pacientes. Este tipo de dietas pueden ser de tres tipos:

- Evitar alimentos específicos que generen disfunción y atragantamiento en el paciente.
- Eliminación de seis alimentos con gran carga alergénica y reintroducirlos de forma empírica.
- Dietas elementales basadas fórmulas de aminoácidos hipoalergénicas.

Desde que los eosinófilos se asociaron con las reacciones alérgicas, los alérgenos alimentarios han sido propuestos como un factor instigador del desarrollo de la patogénesis de la EoE, existiendo múltiples estudios que sustentan esta hipótesis, siendo Kelly y cols. los que presentaron las primeras evidencias [243]. Se ha visto, que las dietas de eliminación de alimentos potencialmente alergénicos, contribuyen a una mejoría de los síntomas e incluso producen cambios a nivel histológico, especialmente en niños [230]. Un grupo de pacientes con EoE del presente estudio fueron sometidos a una dieta de eliminación de seis alimentos, provocando una mejoría en los síntomas de la enfermedad en un alto porcentaje de los casos. Además, en estos pacientes los niveles de SOCS3, pero no de SOCS1, se redujeron significativamente (Figura 25). Esta disminución de SOCS3 en el esófago de los pacientes con EoE apunta a una clara modulación de este supresor al inhibir la respuesta inmune inflamatoria, de tipo Th2. La variación de los niveles de SOCS3 dependiendo de la gravedad de la enfermedad, erigen a esta molécula como un posible biomarcador, tanto de diagnóstico como de pronóstico, en la esofagitis eosinofílica, aunque para confirmar estos resultados sería necesario incrementar el número de pacientes.

5.2.3. REGULACIÓN DE SOCS3 EN EOSINÓFILOS

Dejando al margen los resultados de expresión obtenidos en eosinófilos de sangre periférica de los pacientes con EoE, la elevada expresión de SOCS3 en los eosinófilos circulantes de los enfermos de BENA y asma obtenida, ha sido el origen de un amplio estudio en eosinófilos sobre la regulación de este supresor y su posible función.

La expresión génica de SOCS3 en eosinófilos de sujetos sanos aumenta tras la estimulación con las citocinas Th2 típicas como son las IL-4, IL-5 e IL-13 (Figura 26), corroborando la importancia de SOCS3 en la polarización de la respuesta inmune hacia un ambiente Th2. Además, existe una correlación entre los niveles de expresión de SOCS3 en los eosinófilos de los pacientes con patologías Th2 y los niveles de IgE en suero ($r=0,5$, $P<0,05$); indicando una relación entre ambos tras la estimulación con la citocina IL-4.

DISCUSIÓN

También fue analizado el efecto de la estimulación con $\text{IFN}\gamma$ en la expresión de SOCS3 en eosinófilos purificados (Figura 27). Aunque se llega a reflejar un ligero aumento de expresión, tiempo y dosis dependiente, no se alcanzan diferencias significativas con los controles sin estimular.

El $\text{IFN}\gamma$ participa en la respuesta Th1, contrarrestando los efectos de las citocinas Th2 [244]. SOCS3 se encuentra aumentado fundamentalmente en estas últimas y además, se ha visto que no es uno de los reguladores esenciales de la expresión del $\text{IFN}\gamma$, que activa principalmente STAT1 y por lo tanto la respuesta es controlada por SOCS1 [245]. Aún así, en la actualidad no existe ninguna duda de la participación indiscutible del $\text{IFN}\gamma$ en la enfermedad asmática [246], sobre todo en los fenotipos de carácter no-atópico, en los que este factor se encuentra elevado en los pacientes con este endotipo de asma, generalmente debido a un entorno con alta carga de agentes infecciosos, como ocurre en las poblaciones con asma infantil de los países subdesarrollados [247]. Los elevados niveles de $\text{IFN}\gamma$ atenúan las respuestas Th2 a favor del establecimiento de respuestas Th1 mediante, entre otros, mecanismos epigenéticos como la acetilación del promotor de *INFG* en células T CD4⁺ [248].

Otro de los factores que se ha estudiado como posible modulador de la expresión de SOCS3 ha sido la PGE_2 , uno de los principales metabolitos del tracto respiratorio inferior, producido mayoritariamente por el epitelio y la musculatura lisa de las vías respiratorias. La PGE_2 desempeña funciones antagónicas en el sistema respiratorio, por un lado de broncoprotección si actúa a través de los receptores EP₂ y EP₄, y por otro, fomentando los procesos inflamatorios gracias a la activación de los receptores EP₁ y EP₃, los cuales va a participar en la polarización de la respuesta inmune hacia un fenotipo Th2, y consecuentemente van a contribuir al aumento de la secreción de interleucinas como la IL-5 y la IL-4. En eosinófilos humanos purificados de sangre periférica la PGE_2 es capaz de estimular la expresión de SOCS3 (Figura 28). Existen varios estudios que reflejan que el tratamiento con PGE_2 , además de estimular la expresión de SOCS3 en varios tipos celulares como los neutrófilos y células PBMC, prolonga la estabilidad del ARNm de SOCS3 a través de un aumento de AMPc e IL-10, que van a actuar sinérgicamente a través de un mecanismo desconocido que posiblemente involucre una serie de eventos post-transcripcionales relacionados directamente con la acumulación de SOCS3 [249-251]. La regulación ejercida por la PGE_2 sobre la expresión de SOCS3 quedó demostrada hace unos años por Barclay y cols. al caracterizarse el promotor de SOCS3 en la línea T47D de células de cáncer de mama. El promotor descrito, se activa gracias a la presencia de la prostaglandina PGE_2 que al unirse al receptor EP₄ en una acción llevada a cabo independientemente de las proteínas STAT, promueve la interacción de la proteína Sp1 al promotor, iniciándose la transcripción génica de SOCS3, sin observarse un aumento de la síntesis proteica del supresor, lo que favorece la acumulación de ARNm de SOCS3 [250].

En resumen, el aumento de la expresión de SOCS3 en eosinófilos estimulados por citocinas Th2 como la IL-5, la IL-4 y la IL-13 y/o la prostaglandina PGE_2 , favorece el establecimiento de un fenotipo Th2 en estas células, necesario para el establecimiento del asma alérgico, protagonista de la presente tesis.

En el caso de la BENA, es posible que la elevada expresión de SOCS3 en eosinófilos, esté íntimamente relacionada con los elevados niveles de PGE₂ encontrados en las muestras de esputo de estos pacientes, y que desempeñe un papel clave en el mantenimiento de la eosinofilia característica de la enfermedad.

5.2.4. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE SOCS3 EN EOSINÓFILOS PURIFICADOS DE PACIENTES ASMÁTICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE SILENCIAMIENTO GÉNICO

Tras constatar la expresión de SOCS3 en eosinófilos humanos, así como su regulación por citocinas Th2 y PGE₂, se realizaron ensayos funcionales para analizar el papel que desempeña este supresor en los eosinófilos; en este caso, se utilizaron eosinófilos procedentes de pacientes asmáticos. Se utilizó la técnica de silenciamiento para llevar a cabo el análisis. El silenciamiento de SOCS3 en eosinófilos humanos permite establecer una relación directa entre la función biológica estudiada, y la disminución de la expresión del supresor. Existen infinidad de métodos de transfección descritos en la literatura para llevar a cabo el silenciamiento de un gen concreto en una célula [252]; pero los intentos realizados para tratar de introducir el ARNsi en los eosinófilos con ayuda de algunos agentes como los lípidos catiónicos y/o electroporación, resultaron fallidos. Estos métodos son extremadamente ineficientes y altamente variables, aumentando la adherencia de los eosinófilos y la muerte celular, lo que deriva en la pérdida de muchas células y la dificultad de extrapolar los resultados, por lo que se descartó el uso de cualquier reactivo y/o método de transfección, añadiendo el *pool* de ARNsi específicos de SOCS3 directamente al cultivo, únicamente disueltos en agua bidestilada y libre de nucleasas, obteniendo resultados positivos. Goplen y cols. [202] demostraron que la captación del ARNsi por parte del eosinófilo se realiza de forma espontánea; siendo este proceso dependiente de la activación de la maquinaria de endocitosis. En la activación de la maquinaria endocítica participa la proteína dinamina, que es una GTPasa, que se encarga de facilitar el estrangulamiento de las vesículas endocíticas para separarse de la membrana plasmática y constituir una vesícula independiente, que en el citoplasma celular, liberará su contenido. En este sentido, el silenciamiento de la proteína dinamina II en eosinófilos disminuye la internalización de ARNsi lo que demuestra la importancia de esta proteína en la eficacia del silenciamiento génico [202].

El silenciamiento de SOCS3 obtenido en eosinófilos de pacientes asmáticos, añadiendo de forma directa el *pool* de ARNsi a los cultivos, ha sido corroborado tanto a nivel génico como proteico. La expresión de proteína de SOCS3 se redujo 26 veces en comparación con los eosinófilos tratados con el control negativo de ARNsi, mientras que los niveles de ARNm de SOCS3 disminuyeron a la mitad (Figura 29). La discordancia entre el efecto a nivel génico y el obtenido a nivel proteico, es muy común [253, 254]. El silenciamiento génico en eosinófilos afecta drásticamente a la producción proteica de SOCS3, eliminándose casi por completo, debido a un posible desajuste en el proceso de transducción al disminuir la cantidad de transcritos disponibles.

DISCUSIÓN

En cambio, en el modelo animal de asma alérgica crónica, la expresión de SOCS3 tras el silenciamiento en los pulmones se redujo a la mitad y concordaba con los niveles de ARNm (Figura 40), posiblemente por tratarse de una terapia más general, afectando a múltiples células de las vías respiratorias y no sólo a los eosinófilos. La eliminación casi completa de la expresión de SOCS3 en los eosinófilos ha generado resultados diferentes de los extraídos del silenciamiento parcial en el modelo animal, fundamentalmente relacionados con el estado de fosforilación de STAT3.

Al suprimir la expresión de gran parte de la proteína SOCS3 presente en el citoplasma de los eosinófilos (Figura 29), la vía JAK/STAT permanece constitutivamente activada (Figura 38), aumentando el estado de fosforilación del intermediario STAT3 [255]. En cambio, en el modelo animal, el silenciamiento de SOCS3 consigue modular el eje de activación/supresión (Figura 53). Esta diferencia es debida principalmente a que en el caso del silenciamiento de los eosinófilos de pacientes con asma *in vitro*, los niveles de SOCS3 se eliminan casi completamente para evaluar la función del supresor; sin embargo, en los ratones, la reducción de los niveles de SOCS3 en las vías respiratorias tiene una finalidad terapéutica, con la intención de restaurar los niveles fisiológicos de SOCS3 que regulan la vía JAK/STAT. Esta supresión parcial es la alternativa terapéutica más adecuada, ya que la delección genética de SOCS3 es causa directa de letalidad en el embrión debido a un aumento descontrolado de la activación de STAT3 y las quinasas MAP [256, 257], por lo que se debe trabajar siempre con estrategias que inhiban parcialmente a este supresor, ya que la inhibición total tendría efectos deletéreos en nuestro modelo experimental.

Otra de las vías en las que se ha descrito que participa SOCS3 es la vía Ras/ERK [258]. El silenciamiento de SOCS3 en eosinófilos purificados de sangre periférica de pacientes asmáticos no modifica el estado de fosforilación de ERK (Figura 38). Sin embargo, la inhibición de esta vía ha sido utilizada como terapia en la patología asmática debido a su implicación en la activación de la musculatura lisa [259-261]; además en el esófago de los pacientes con esofagitis eosinofílica, el aumento de expresión de SOCS3 correlaciona con los niveles de MAPK1, y la fosforilación de ERK está incrementada en los tejidos esofágicos afectados (Figura 22), confirmándose la activación de esta vía en una de las enfermedades Th2 estudiadas. En un estudio llevado a cabo en 2010 por Bates y cols. se describe un aumento de la activación de la vía Ras/ERK en los eosinófilos de las vías respiratorias en comparación con los eosinófilos de sangre periférica estimulados ambos con IL-5 y GM-CSF [262]. Los resultados arrojados por este trabajo, junto con los extraídos de la presente tesis, constatan la importancia de esta vía en los eosinófilos una vez infiltrados en el tejido diana, como pueden ser los pulmones o el esófago, aumentando sus funciones potencialmente efectoras como la migración, la adhesión y la degranulación. Sin embargo, existen trabajos anteriores en los que la activación de la vía Ras/ERK en eosinófilos de sangre periférica, se relaciona con la migración y la degranulación de estas células, mediante la estimulación con eotaxina o un péptido quimioatrayente sintético, en vez de IL-5 y GM-CSF [238, 263]. Por lo tanto, la ausencia de un estímulo quimiotáctico potente, parece ser la causa de la inactivación de la vía Ras/ERK en los eosinófilos de sangre periférica.

En consonancia con el modelo animal de asma alérgica crónica, en los eosinófilos de los pacientes asmáticos interferidos con el ARNsi de SOCS3, la expresión génica de SOCS1 no se modifica (Figura 30).

Los mismos resultados se obtuvieron para SOCS5, que además no varía su expresión entre pacientes con enfermedades Th2, como el asma y la BENA, y sujetos sanos de forma significativa (Figura 30 y 17 respectivamente). De este modo, es posible establecer una relación directa entre las modificaciones observadas, tanto en la señalización intracelular, como en la variación del perfil de expresión de la respuesta inmune y la alteración de diversas funciones, y el efecto de reducción de la expresión de SOCS3 como consecuencia del silenciamiento en los eosinófilos de los pacientes.

5.2.4.1. La supresión de la expresión de SOCS3 modifica la respuesta inmune en los eosinófilos

Para evaluar qué ocurre con la respuesta de los eosinófilos tras el silenciamiento de SOCS3, se analizaron los factores reguladores de transcripción más importantes en el establecimiento de tres fenotipos celulares: T-bet en el caso de células Th1, GATA-3 en la condición Th2 y FOXP3 en el fenotipo T regulador. De todos ellos, el único descrito con anterioridad en eosinófilos es el factor GATA-3 [211], pero dada la plasticidad funcional de los eosinófilos se quiso analizar además la expresión de T-Bet y FOXP3 para profundizar en el tipo de respuesta inmune, e inclusive, poder llegar a establecer fenotipos según se exprese predominantemente uno u otro, como ocurre en los linfocitos T [264], en los macrófagos [265] o como recientemente se ha descrito en los neutrófilos [266].

En primera instancia cabe destacar que, por primera vez, se ha detectado expresión génica de los factores reguladores de la transcripción T-Bet y FOXP3 en eosinófilos humanos (Figura 31 y 32 respectivamente).

La interferencia de la expresión de SOCS3 en eosinófilos da lugar a la inhibición de la respuesta Th2, gracias a la reducción de la cantidad de transcritos de GATA-3, factor transcripcional clave en la polarización hacia el fenotipo Th2. En cambio, el factor de transcripción máster para el establecimiento de un fenotipo Th1, T-bet, no ve alterados sus niveles de ARNm, tras el silenciamiento de SOCS3 en eosinófilos (Figura 31).

Estos datos corroboran la importancia de SOCS3 en el mantenimiento de la polarización de la respuesta inmune Th2 en detrimento de las respuestas Th1 en eosinófilos, de igual modo que tiene lugar en los linfocitos T [244].

Por otro lado, tanto la expresión del factor de transcripción FOXP3, máximo influyente de la expresión del fenotipo regulador, así como la expresión de IL-10, citocina principalmente secretada como consecuencia del establecimiento de este tipo de respuesta, se ven afectadas tras el silenciamiento de SOCS3 en los eosinófilos humanos, reduciéndose sus niveles de ARNm (Figura 32). En conjunto, estos resultados indican que SOCS3 ejerce un efecto modulador de la respuesta inmune en los eosinófilos de los pacientes asmáticos, manteniendo una fuerte polarización del

fenotipo Th2 y regulador. La relación existente entre SOCS3 y las respuestas Th2 es clara [212, 215, 267]; en cambio, en la bibliografía existen trabajos que establecen diferentes efectos entre la expresión de SOCS3 y el establecimiento de un fenotipo regulador. Por ejemplo, en los linfocitos T, la reducción de la expresión de SOCS3 va asociada a un aumento de los niveles de IL-10 y CTLA-4, y en consecuencia a un mejor pronóstico en la resolución de la inflamación en una enfermedad autoinmune como la uveitis [268]. En contraste, en células dendríticas y en el líquido sinovial recogido de procesos artríticos, la presencia de SOCS3 se relaciona con la producción de IL-10. En el caso particular de la artritis gotosa aguda, el aumento de SOCS3 origina una elevación de IL-10, TGF β ₁ y receptores del TNF solubles, colaborando a la resolución espontánea de la artritis aguda [171]. Por otro lado, en las células dendríticas la expresión de IL-10, gracias a la activación de SOCS3, genera un fenotipo regulador en estas células contribuyendo a la resolución de numerosos procesos [269] como la artritis [270] y la inflamación intestinal [271].

Estos datos apoyan a los resultados obtenidos en los eosinófilos de los pacientes con asma, en los que la expresión de SOCS3 es fundamental para la definición del fenotipo regulador IL-10⁺FoxP3⁺, del mismo modo que en el modelo de asma alérgica crónica, la modulación de los niveles de SOCS3, da lugar a una elevación de IL-10, necesaria para que el proceso inflamatorio comience a remitir.

5.2.4.2. Relación entre la expresión de SOCS3 y la modulación de diversas funciones en el eosinófilo

5.2.4.2.1. Migración

La migración de los eosinófilos hacia el foco de activación de la respuesta inflamatoria, inducida por la sensibilización a un determinado antígeno, se produce gracias a la integración de varias señales quimiotácticas. Las eotaxinas son las moléculas que participan en la regulación del tráfico leucocitario. Son especialmente importantes en los eosinófilos, siendo las responsables directas de su acumulación en los pulmones y otros órganos, tras la activación de un proceso alérgico [272, 273]. La actividad de las eotaxinas se orquesta gracias a la expresión selectiva, principalmente en eosinófilos, del receptor transmembrana acoplado a proteínas G: CCR3 [274, 275], de hecho, la deficiencia del gen de CCR3 produce un menor reclutamiento de eosinófilos en los pulmones en animales sometidos a un protocolo de sensibilización con el antígeno OVA [276].

La relación sinérgica existente entre la IL-5 y la eotaxina, potencia el aumento de la expresión y la agregación del receptor CCR3 [277], a la vez que reduce la tasa de internalización del mismo mediada por la proteína clatrina que recubre las vesículas endocíticas en el proceso de transporte entre membranas [278]. Una vez que el ligando, en este caso la eotaxina, se une al receptor, se inician una serie de eventos, como la activación del flujo de calcio y la polimerización de actina entre otros [279], que favorecen el tráfico del eosinófilo hacia su destino final. El silenciamiento de SOCS3 inhibe la expresión en la superficie de los eosinófilos del receptor CCR3 (Figura 34), como indican los datos obtenidos por citometría de flujo, y por tanto la migración se ve reducida, a pesar de la

presencia de IL-5 en el cultivo (Figura 33). Estos resultados demuestran la importancia de la expresión de SOCS3 en los eosinófilos de pacientes asmáticos como un nuevo factor implicado en el proceso de la migración.

5.2.4.2.2. Adhesión

Los eosinófilos deben atravesar la barrera endotelial que separa el torrente sanguíneo del sitio inflamatorio. Los eosinófilos activados expresan en su superficie celular, una serie de moléculas de adhesión que les permite establecer interacciones con las células endoteliales y así, constituir el anclaje inicial y la subsiguiente extravasación. La eliminación casi total de la expresión de SOCS3 en eosinófilos, provoca una pérdida de la capacidad de adhesión de estas células en presencia de citocinas características del ambiente inflamatorio Th2 como son la IL-5 y la IL-13 (Figura 35). En este sentido, la IL-5 ha sido descrita previamente como un inductor de la adhesión de los eosinófilos al endotelio vascular [69], mientras que la IL-13 va a participar activamente en la quimiotaxis de los eosinófilos, esencial para la estimulación del inicio del proceso adhesivo [280]. Por lo tanto, es posible que ambas citocinas ejerzan sus efectos pro-adhesivos a través de SOCS3.

La reducción de la capacidad de adhesión de los eosinófilos también se observa tras añadir al cultivo PGE₂ (Figura 35). Hace unos años, Sturn y cols. describieron a la PGE₂ como un inhibidor del tráfico de eosinófilos, ejerciendo su efecto a través de los receptores EP₂ [281]. Existen muchas líneas de investigación centradas en la importancia de los metabolitos del ácido araquidónico en relación con la regulación del tráfico celular [282, 283]. De hecho, la terapia con antagonistas de los receptores de los cisteinil-leucotrienos de tipo I reduce la eosinofilia en pulmón y es uno de los tratamientos aprobados para la enfermedad asmática. La estimulación con IL-4 no varía de forma significativa la función adhesiva de los eosinófilos, probablemente porque la función principal de esta citocina esté centrada en el cambio de isotipo de inmunoglobulinas y la polarización de la respuesta Th2, activando la transcripción de factores necesarios para su propagación.

La interferencia de SOCS3 en los eosinófilos desencadena una reducción de la expresión de todas las moléculas implicadas en los procesos de adhesión analizadas (Figura 36). Además, cabe destacar que el silenciamiento de SOCS3 en los eosinófilos origina un marcado descenso particularmente en la expresión de LFA-1 y la integrina α -2, a pesar de la estimulación posterior con IL-5, uno de los mayores inductores de los procesos de adhesión y migración [284].

Las integrinas son proteínas transmembranales heterodiméricas constituidas por una subunidad α y otra β , cuyas funciones principales son la mediación de interacciones entre células y la adhesión celular a la matriz extracelular. Gracias a sus regiones citoplásmicas, las integrinas se asocian a múltiples proteínas encargadas de reorganizar el citoesqueleto. También participan en la señalización intracelular modulando el crecimiento celular y la apoptosis [285, 286]. En el estudio se ha evaluado la expresión en superficie de algunas de estas integrinas como son LFA-1(α _L β ₂), VLA-4(α ₄ β ₁) y sus respectivos ligandos ICAM-1 y VCAM-1 pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y la subunidad α ₂ que forma parte del dímero α ₂ β ₁ (VLA-2) que une colágeno de

tipo I y III, ya que estas moléculas son muy importantes a la hora de direccionar a los eosinófilos hacia los sitios donde la inflamación alérgica tiene lugar [287-290].

El reclutamiento de eosinófilos y su activación en el foco inflamatorio en el caso del asma alérgica se ha visto que está mediado principalmente por una combinación de las integrinas VLA-4 y LFA-1 [291]; en concreto la estimulación con IL-5 y GM-CSF en eosinófilos humanos purificados de sangre periférica aumenta la expresión de LFA-1 y en consecuencia la adhesión y migración de estas células de forma inmediata tras la primera exposición alérgica [292]. La inhibición de la función de estas moléculas en los eosinófilos y otras células, mediante el uso de anticuerpos monoclonales [291] o inhibidores farmacológicos [293], ha revelado resultados prometedores como terapia frente a la inflamación pulmonar. Es posible que SOCS3 controle la inducción de las moléculas de adhesión en la superficie de los eosinófilos a través de la activación del factor NF- κ B [294, 295] directamente relacionado con el proceso de adhesión [296].

5.2.4.2.3. Degranulación

La liberación del contenido de los gránulos citoplasmáticos al espacio extracelular, proceso conocido como degranulación, es una de las funciones efectoras clave durante la vida del eosinófilo al alcanzar el foco inflamatorio. La degranulación más agresiva es la de tipo citolítico, en la que el eosinófilo vacía completamente su contenido de gránulos catiónicos pre-formados. Aunque, frecuentemente es un proceso más controlado el que tiene lugar, donde el eosinófilo libera sólo pequeñas partes del contenido de sus gránulos, manteniendo su integridad celular [297]. En el presente trabajo se ha inducido la degranulación total de los eosinófilos mediante la adición a los cultivos de la anafilotoxina C5a, integrante de la cascada del complemento. La estimulación de los eosinófilos con IL-4, IL-5 e IL-13 a los tiempos y dosis en los que la expresión de SOCS3 alcanzó su máximo, inhibe dicho proceso de degranulación citolítica [212]. En contraste, la reducción de la expresión de SOCS3 mediante su silenciamiento génico elimina el control ejercido por el supresor, lo que conduce a un drástico incremento de la degranulación tras la estimulación con las mismas citocinas Th2 (Figura 37).

En conjunto, la supresión de SOCS3 en eosinófilos de pacientes asmáticos conduce a una inhibición de la migración y de la adhesión, evitando la extravasación de los eosinófilos al foco inflamatorio; y un aumento de la degranulación citolítica, que disminuye su vida media en el torrente sanguíneo y las posibilidades de alcanzar el tejido diana para acometer eficazmente dicha función efectora.

En la figura 55 se esquematiza la posible relación entre SOCS3 y la actividad de los eosinófilos de los pacientes asmáticos purificados de sangre periférica elucidada gracias a la herramienta del silenciamiento génico. La eliminación casi completa de proteína de SOCS3 revierte el efecto del supresor fomentando la degranulación citolítica en los eosinófilos de sangre periférica al inhibirse la tanto la migración como la capacidad de adhesión, ambas acciones necesarias para producirse la extravasación de estas células al foco inflamatorio.

Esta pérdida de regulación es debida a una activación constitutiva de la vía JAK/STAT y a la disminución de la expresión de los factores de la transcripción GATA-3 y FOXP3 que promovían un fenotipo regulador en los eosinófilos.

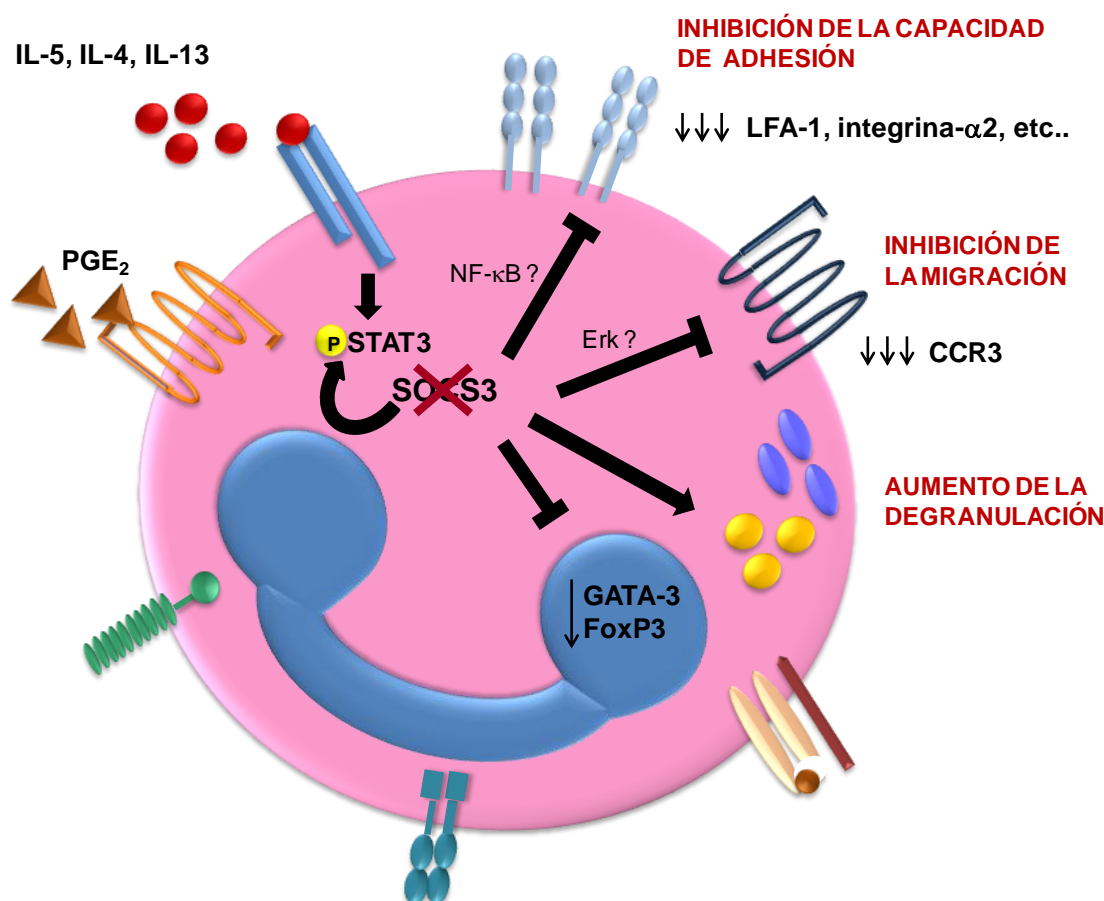


Figura 55. Función de SOCS3 en los eosinófilos de pacientes asmáticos purificados de sangre periférica. La elevada expresión de SOCS3 en los eosinófilos de sangre periférica de los pacientes asmáticos se induce por un ambiente pro-inflamatorio constituido entre otros factores por citocinas Th2 (IL-5, IL-4 e IL-13) y mediadores lipídicos como la PGE₂ que activan, entre otros intermediarios, a STAT3. El silenciamiento génico de SOCS3 activa constitutivamente la fosforilación de STAT3, reduciéndose la transcripción de factores de regulación de la respuesta inmune como GATA-3 y FOXP3, así como la expresión de moléculas de adhesión (LFA-1, VLA-4 y del receptor de la eotaxina CCR3 que en conjunto, contribuyen a una inhibición de la migración y la adhesión en los eosinófilos, a la vez que aumenta la degranulación citolítica.

Por lo tanto, la presencia de SOCS3 parece estar vinculada con un aumento de la vida media del eosinófilo en el torrente sanguíneo, gracias a la inhibición de la degranulación y a la vez que se aumenta la movilización de este tipo celular desde la médula ósea, debido a la activación de mecanismos de migración y adhesión. En parte, todo ello es posible, al establecerse un fenotipo mixto Th2/regulador persistente potenciado por la expresión de SOCS3 en los eosinófilos, que va a contribuir a la eosinofilia periférica característica de los pacientes con asma alérgica y otras enfermedades Th2.

5.3. TERAPIA DE SILENCIAMIENTO DE SOCS3 EN UN MODELO ANIMAL DE ASMA CRÓNICA

Los resultados obtenidos en el modelo animal de asma crónica mediante el análisis del perfil de expresión génica y proteica tras ser tratados con Gal-3, ponen de manifiesto la desregulación de la vía de la supresión de la señalización de las citocinas [298]. Esta modulación ha sido posteriormente investigada en eosinófilos humanos purificados de sangre periférica, especialmente en aquéllos procedentes de pacientes con asma mediante la técnica de silenciamiento génico. En conjunto, todos los resultados obtenidos apuntan hacia la contribución indiscutible de SOCS3 a la persistencia de la eosinofilia periférica y por ende, al aumento de la infiltración de eosinófilos en los pulmones que agravan el pronóstico de la patología asmática. Finalmente, teniendo en cuenta la relevancia de SOCS3 en el fenotipo asmático alérgico y altamente Th2, se quiso abordar un análisis más detallado de este supresor en un nuevo modelo de asma alérgica crónica en ratones, utilizando el silenciamiento génico de SOCS3 como terapia.

5.3.1. ELECCIÓN DE UN BUEN MODELO DE ASMA CRÓNICA Y UNA TERAPIA ADECUADA

Los modelos experimentales en animales son buenas herramientas a la hora de elucidar mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades. Bien es cierto que distan de ser perfectos, y generalmente, sólo se consigue una semejanza parcial a los procesos patológicos reales que tienen lugar en el ser humano. Aún así, los estudios en ratones ofrecen muchas ventajas, como son la homogeneidad genética, la inmediata disponibilidad de los individuos gracias a los cortos intervalos de tiempo de reproducción, su fácil manipulación y mantenimiento, o la extensa disponibilidad tanto de herramientas en biología molecular, que han conducido a un minucioso conocimiento del genoma del ratón, como de reactivos que permiten analizar mediadores y células implicadas en múltiples respuestas.

En cualquier caso para analizar la eficacia de una nueva estrategia terapéutica, es imprescindible establecer un modelo animal adecuado. En la literatura científica existen multitud de ejemplos de modelos de asma alérgica que han permitido descubrir nuevas dianas terapéuticas y probar la eficacia de nuevos tratamientos [299, 300]. Con este bagaje previo, se propuso encontrar un buen modelo de asma crónica en el que evaluar los efectos de la terapia con el *pool* de ARN silentes de SOCS3.

La mayoría de los protocolos de inmunización descritos sólo funcionan en cortos espacios de tiempo, y no permiten evaluar muchas de las alteraciones que ocurren en las vías respiratorias humanas a largo plazo en el asma crónica, como son la infiltración eosinofílica, la hiperrespuesta bronquial y las alteraciones estructurales de la pared bronquial, entre otras [301, 302]. Bien es cierto que los modelos de asma aguda han servido para probar fármacos broncodilatadores y analizar el comportamiento fundamentalmente de los mastocitos, que son las células iniciadoras de la respuesta alérgica.

El éxito del mantenimiento del asma crónica en el tiempo, va a depender del tipo de protocolo de inmunización utilizado (aerosolizado, intranasal y con o sin adyuvante) así como de la cepa de ratón seleccionada, ya que poseen una predisposición genética variable a la inducción de este tipo de patologías [302-304]. Una primera aproximación en el desarrollo de modelos de asma crónica, fue la inducción constitutiva de la expresión de citocinas de tipo Th2, como la IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 [305-308]. Siguiendo la misma línea, también se generaron animales deficientes para los factores de transcripción que están implicados en los procesos inflamatorios alérgicos [309]. Sin embargo, estos modelos no son realistas, puesto que no utilizan la ruta de sensibilización natural en el desarrollo del asma alérgico y con el tiempo han caído en desuso.

Es fundamental por lo tanto elegir el protocolo de sensibilización más adecuado para llevar a cabo el estudio. Uno de los antígenos más utilizados y que más éxito han tenido ha sido la ovoalbúmina (OVA). La exposición controlada de ratones BALB/c a concentraciones pequeñas de OVA en forma de aerosol es una de las aproximaciones más empleadas [301, 310]. Sin embargo no es tan fácil de reproducir, ya que se requiere de un sistema específico que controle exactamente la cantidad de antígeno que se dispensa por mm³.

Por lo tanto, se decidió optar por una sensibilización intranasal mediante la instilación de OVA, durante un periodo de cinco semanas. La administración del antígeno intranasalmente respeta la vía de sensibilización natural, asemejándose el proceso a la situación real a la que se enfrenta un paciente alérgico. Además es relativamente sencillo de llevar a cabo, basta con anestesiarse ligeramente a los ratones con isoflurano inhalado y, sin necesidad de ningún sistema especial adicional, se suministra el antígeno, lo que lo hace fácilmente reproducible. Para asegurar una sensibilización efectiva, se optó además por dos inmunizaciones previas mediante inyección intraperitoneal de ovoalbúmina junto con el adyuvante hidróxido de aluminio (AlOH₃). El modelo anteriormente utilizado para comprobar el efecto de la Gal-3, se limitaba exclusivamente a una sensibilización intranasal con OVA cada tres días durante un periodo de 12 semanas [209]. Antes de comenzar el estudio se compararon ambas aproximaciones de forma paralela. Al efectuarse las dos inmunizaciones previas a la sensibilización, se obtuvo un mayor infiltrado eosinofílico, una obstrucción más acentuada del bronquio y una mayor hiperreactividad bronquial, de hecho, durante la prueba de función pulmonar, hubo de reducirse el número de dosis de metacolina, estableciendo como dosis final 24 mg/mL (Figura 43) frente a los 42 mg/mL utilizados en el modelo de asma alérgica crónica inicial, para evitar el sufrimiento del animal [209]. Estos datos hicieron que se descartara el modelo crónico de sensibilización por vía respiratoria previo, y se eligiese el que combinaba la inmunización con la sensibilización periódica posterior, que generaba un proceso inflamatorio más persistente y grave, similar al que ocurre en los pacientes con asma crónica.

Otro punto importante a tener en cuenta es la cepa de ratón utilizada. Se ha visto, que la cepa A/J es la que mejor responde al protocolo de inducción de la inflamación alérgica crónica por vía intranasal. Estos ratones son más susceptibles a desarrollar una elevada hiperreactividad bronquial, además, los niveles de citocinas en el lavado broncoalveolar y los depósitos de colágeno en los

DISCUSIÓN

pulmones, están incrementados en comparación con los ratones de otras cepas como son la BALB/c, C57BL/6 y C3H/HeJ [302, 304]. Esta predisposición génica concuerda con lo observado en la patología de los pacientes con asma, donde la carga genética influye tanto en la aparición como en el desarrollo de la enfermedad. Por todos estos motivos, la cepa A/J fue la cepa de elección para desarrollar el modelo de asma crónica, en concreto en machos, para evitar posibles interferencias de tipo hormonal.

En resumen, se ha reproducido un protocolo de inducción crónica de inflamación eosinofílica por administración intranasal de OVA, en ratones de la cepa A/J previamente inmunizados con el mismo antígeno para potenciar la sensibilización, con el fin de evaluar la eficacia del silenciamiento de SOCS3 en pulmón como posible tratamiento del asma alérgica crónica.

Una vez establecido el modelo animal de asma alérgica crónica, dado que la expresión de SOCS3 se encuentra incrementada y además se correlaciona con la gravedad, se decidió reducir dicha expresión. Una de las técnicas más elegantes disponibles para llevar a cabo este proceso hoy en día es la del silenciamiento génico.

El ARN de silenciamiento (ARNsi) es capaz de unirse a secuencias complementarias del ARN mensajero diana y producir su degradación, siguiendo la vía natural del ARN de interferencia, presente en todas las células eucariotas. El complejo RISC es el encargado principal de llevar a cabo este proceso, y una vez activado puede actuar degradando varios ARNm, lo que propaga el efecto del silenciamiento [311]. Esta potencia añadida asegura efectos terapéuticos de varios días en células en división y, hasta de varias semanas en células sin división [312]. En el modelo animal de asma crónica, se decidió administrar el ARNsi de SOCS3 cada 3 o 4 días, completando un total de 10 dosis. Se estableció la dosis efectiva de ARNsi administrado en 2 μ M, disuelto en un volumen máximo de 15 μ l; este volumen concuerda con el elegido en otros trabajos en los que también se administran moléculas de ARNsi por vía intranasal [195, 196]. Las observaciones realizadas con el microscopio de fluorescencia en cortes de pulmón pusieron de manifiesto la presencia del ARNsi marcado con rodamina en el epitelio bronquial hasta 48 horas después de ser administrados (Figura 39). Además, para evitar dicha degradación, se utilizaron ARNs de silenciamiento modificados químicamente para asegurar su estabilidad a lo largo de la vía respiratoria. Un total de 4 ARNsi, cada uno complementario para una región distinta del ARNm de SOCS3, fueron empleados. Cada dúplex de ARNsi purificado mediante cromatografía HPLC (*High phase liquid cromatoraphy*), se sometía a un proceso de intercambio de iones sodio, desalado, desprotección del extremo 2' eliminando los grupos O-acetoetoxi (ACE) generados durante la síntesis en dicho extremo [313], y por último, se filtraban en condiciones estériles y se descartaba la presencia de endotoxinas. El uso de un *pool* de ARNsi en vez de un único ARNsi asegura la eficiencia del proceso, aumentando la probabilidad de unión al ARNm complementario de al menos dos ARNsi de los cuatro introducidos. En consonancia, en la mayoría de los estudios que recurren al silenciamiento génico como terapia, se utilizan varios ARNsi para degradar el mismo ARNm diana [195, 196, 314].

La vía intranasal fue la elegida para administrar la terapia, puesto que es local y no invasiva. El pulmón es un órgano idóneo como diana para este tipo de tratamiento, por su fácil accesibilidad a través de las vías respiratorias, su extensa superficie y su gran vascularización. La decisión de no utilizar ningún vector no tiene que ver con la generación de posibles respuestas inflamatorias o la toxicidad que podría causar, ya que la mayoría de vectores existentes en la actualidad, no presentan ninguno de estos problemas, sino más bien es un intento de simplificar el proceso, eliminando además un paso de manipulación que fomenta su degradación. El uso de ARNsi “desnudo” como terapia ha tenido cierto éxito en el tratamiento de enfermedades virales como la producida por el virus respiratorio sincitial (VRS) en pulmón, tanto en ratones [195], como en primates [192]. De hecho, existen en marcha ensayos clínicos en humanos para tratar la misma infección, actualmente en fase II [200].

De entre todos los trabajos existentes en la literatura, cabe destacar el llevado a cabo por Moriwaki y cols. en 2011 [175], en el cual primero silencian el gen de SOCS3 en células T *in vitro*, para a continuación realizar una transferencia adoptiva de estas células T mediante inyección intravenosa a ratones alérgicos. Esta aproximación resulta mucho más complicada, y la terapia se efectúa a nivel sistémico en vez de a nivel local. También es importante tener en cuenta que existen otras células en las vías respiratorias, además de los linfocitos T y los eosinófilos, que probablemente tengan niveles elevados de expresión de SOCS3, y por tanto, la terapia no dirigida a ningún tipo celular en concreto, debería ser más efectiva, como es el caso del silenciamiento génico efectuado en el presente trabajo.

5.3.2. ESPECIFICIDAD DE LA TERAPIA DE SILENCIAMIENTO DE SOCS3

El silenciamiento de SOCS3 en los pulmones del grupo de ratones asmáticos tratados ha sido minuciosamente comprobado tanto a nivel génico por PCR cuantitativa, como a nivel proteico por western blot para asegurar la especificidad del tratamiento (Figura 40). El hecho de que no existan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo asmático sin tratar y el tratado con el ARNsi control negativo, confirma que la reducción de la expresión de SOCS3 observada en los pulmones de los ratones, es producida inequívocamente por el ARNsi de SOCS3 administrado intranasalmente. Además, resulta muy interesante comprobar que la técnica de silenciamiento no elimina totalmente los niveles ni de ARN mensajero ni de proteína, sino que consigue restablecer los niveles basales de SOCS3 que operan en condiciones homeostáticas en el pulmón y que regulan la activación de distintas vías de señalización de factores y citocinas, en vez de eliminar completamente su expresión. En este sentido, existen multitud de trabajos en los que la recuperación de los niveles naturales de la proteína diana mediante la modulación obtenida con el silenciamiento génico, generan resultados terapéuticos muy prometedores tanto en el asma como en otras enfermedades [310, 315].

DISCUSIÓN

Aunque las funciones de SOCS1 y SOCS3 son diferentes, la homología de secuencia entre ambos es muy elevada [153]. Por ello también se verificó que la expresión de SOCS1 en los pulmones no sufría cambios tras la administración del ARNsi de SOCS3 (Figura 41) corroborándose la especificidad de la técnica.

Puesto que la terapia acometida tiene como única diana el pulmón, donde los niveles de SOCS3 están desregulados en la patología asmática; se comprobó que el ARNsi no hubiera alterado la expresión de SOCS3 en otros órganos como son el bazo, órgano linfoide secundario fundamental para el mantenimiento de la inmunidad humoral y el hígado, de gran capacidad metabólica (Figura 42). La eliminación específica de SOCS3 en el hígado de ratones resulta en un aumento de la lipogénesis, dando lugar a la formación de hígado graso y fomentando la obesidad [316], además en las respuestas proliferativas de tipo neoplásico, la pérdida de la expresión de SOCS3 en el hígado contribuye a una mayor supervivencia, proliferación de los hepatocitos y a la formación de carcinomas hepatocelulares [317]. La reducción de SOCS3 en el hígado es devastadora, en cambio en otros órganos como el corazón, su presencia se relaciona con efectos cardioprotectores [318], y en el cerebro la inhibición conjunta de SOCS3 y PTEN se ha visto que desbloquea el crecimiento axonal [319]. En el modelo de asma crónica, el silenciamiento génico de SOCS3 se produce exclusivamente en el pulmón, evitando alterar la funcionalidad de SOCS3 en el resto de órganos, lo que reduce posibles efectos secundarios de la terapia.

5.3.3. EFICACIA DEL SILENCIAMIENTO DE SOCS3 EN EL MODELO DE ASMA CRÓNICA EN LA REVERSIÓN DE LOS PROCESOS DE HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL, INFLAMACIÓN Y REMODELADO

La terapia de silenciamiento de SOCS3 en los ratones a los que se les había inducido asma, ha dado lugar a una reducción generalizada de los principales marcadores de la enfermedad, entre los que se incluyen la inflamación pulmonar, disminuyéndose fundamentalmente el infiltrado eosinofílico, la hiperreactividad bronquial (HRB) y la presencia de depósitos de colágeno y moco en las paredes bronquiales.

Los resultados obtenidos, indican la existencia de una reducción estadísticamente significativa en la respuesta frente a la estimulación colinérgica por metacolina en el grupo de ratones tratados con el ARNsi de SOCS3 frente a los grupos OVA y OVA C- ARNsi (Figura 43). Estos datos son consecuentes a los obtenidos en el trabajo realizado con anterioridad en el laboratorio por Lopez y cols, en los que la disminución del porcentaje de eosinófilos produce una mejoría de la HRB [209]. A pesar de los resultados obtenidos en el modelo animal de asma alérgica tratado con Gal-3, los inhibidores de la IL-5 han sido objeto de controversia a la hora de ser relacionados con la reducción de la HRB [109]. El silenciamiento génico de SOCS3, además de disminuir los niveles de IL-5, afecta a la expresión de otras citocinas como la IL-13 (Figura 50), relacionada directamente con la HRB [320]. La importancia de la IL-13 en la generación y persistencia de la HRB, ha supuesto un aumento del auge de terapias cuya diana principal es dicha interleucina, generándose anticuerpos

monoclonales tanto para erradicar la hiperreactividad, así como parte de la inflamación típica del asma [321].

La inflamación es una de las características indiscutibles presente en la patología asmática. En este trabajo, se ha tratado de analizar de forma detallada la presencia y variación del infiltrado celular en los ratones con asma alérgica crónica, tratados con el ARN de silenciamiento de SOCS3. La cantidad de células totales presentes en los lavados broncoalveolares de los ratones en los que se silenció la expresión de SOCS3, fue similar a la encontrada en los ratones sanos. Esta reducción del número total de células en las vías respiratorias, junto con los resultados observados en las tinciones con hematoxilina-eosina en cortes de pulmón, demuestran que, la administración intranasal de ARNsi de SOCS3 es un tratamiento muy eficaz; provocando un aclaramiento prácticamente total de los infiltrados inflamatorios (Figura 47).

El eosinófilo es una de las principales células infiltradas, implicadas en el asma. La importancia de los eosinófilos en el inicio y desarrollo de dicha patología es indiscutible [322, 323]. La terapia con el ARNsi de SOCS3 disminuye drásticamente la presencia de los eosinófilos en los lavados broncoalveolares analizados de los ratones asmáticos tratados en comparación con los ratones sin tratar (Figura 46). Además, esta reducción en el porcentaje de eosinófilos, se correlaciona con la expresión de SOCS3 en pulmón ($r=0,97$, $P<0,05$). Estos resultados indican que la restauración de los niveles de expresión de SOCS3 en las vías respiratorias de los ratones asmáticos, gracias al efecto terapéutico del silenciamiento, inhibe exitosamente el reclutamiento de los eosinófilos en dicho tejido.

Los avances en las técnicas de obtención de imágenes, junto con el desarrollo de proteínas fluorescentes y sondas específicas, han propiciado la aparición de nuevas herramientas en la investigación biomédica que permiten determinar de una forma no invasiva a nivel macroscópico y microscópico diferentes procesos biológicos. Uno de los últimos logros en la tecnología de fotones ha sido la tomografía de fluorescencia molecular (TFM), que permite la detección y localización de fluorescencia en los tejidos, así como su cuantificación volumétrica *in vivo*. Los eosinófilos pulmonares son capaces de producir una gran variedad de proteasas, entre las que se incluyen las catepsinas B, L y S [324, 325]. La cuantificación de actividad catepsina es muy específica de la eosinofilia pulmonar. Esto es debido principalmente a su localización intracelular que, a diferencia de otras enzimas utilizadas como las metaloproteinasas, que también están implicadas directamente en la inflamación pulmonar, se secretan extracelularmente, lo que permite asociar su actividad a la existencia de un mayor o menor infiltrado eosinofílico [326]. El uso de la sonda fluorescente activable por catepsinas ProSense 680 permitió cuantificar *in vivo* la eosinofilia pulmonar en cada ratón. La cantidad de sonda detectada se reducía en los pulmones de los ratones tratados con el ARNsi de SOCS3, siendo similar a la obtenida en los ratones control y alcanzando significación estadística, si se comparaba con la cuantificación obtenida en los pulmones de los ratones asmáticos sin tratar (grupos OVA y OVA C-ARNsi, figura 45).

DISCUSIÓN

Otra de las técnicas *in vivo* empleadas ha sido la tomografía computarizada de rayos-X (TC). Los resultados generados han arrojado información novedosa, tanto de la estructura, como de la anatomía del pulmón, durante el proceso de cronificación. En las imágenes mostradas en la figura 44, se observa un incremento de la densidad en ciertas regiones pulmonares donde está teniendo lugar el proceso inflamatorio, así como un estrechamiento de la luz de la arteria pulmonar.

Estas áreas más blanquecinas, asociadas con la acumulación de líquido, se redujeron drásticamente en los ratones a los que se les administró el ARNsi de SOCS3.

En conjunto, estas dos técnicas permiten visualizar y cuantificar inflamación de forma longitudinal y no invasiva en el pulmón, a la vez que permiten comprobar la eficacia de la terapia *in vivo*.

La fibrosis subepitelial se produce como consecuencia de acúmulos principalmente de colágeno y fibronectina, así como de otras proteínas de la matriz extracelular (MEC), como la tenascina y la laminina.

La tinción Tricrómica de Masson en cortes de pulmón reveló la existencia de estos depósitos en forma de acúmulos verdosos alrededor de la estructura bronquial (Figura 48), fundamentalmente en los grupos de ratones sensibilizados a OVA y no sometidos al tratamiento de silenciamiento de la expresión de SOCS3. Este resultado destaca la eficacia del tratamiento en la reducción de la fibrosis subepitelial, y por lo tanto en la inhibición del proceso de remodelado bronquial.

La evaluación de la hiperplasia y la secreción de moco por parte de las células caliciformes del epitelio bronquial, mediante la técnica de PAS/Alcian Blue, pone de manifiesto que la disminución de los niveles de expresión de SOCS3 a nivel pulmonar, también previene el remodelado bronquial característico del proceso de cronificación de la enfermedad, al desaparecer por completo los depósitos de moco, en la luz del bronquio (Figura 49).

El silenciamiento de SOCS3 a nivel pulmonar disminuye la expresión de las tres principales citocinas Th2: IL-5, IL-4 e IL-13 (Figura 50), debido a la pérdida parcial de proteína SOCS3 que elimina el bloqueo ejercido sobre STAT4 que impedía su completa activación a través de la cadena β del receptor de la IL-12 [156]. Este mecanismo revierte en parte la polarización de la respuesta Th2, y por tanto, la producción de las citocinas Th2 características se ve afectada. La IL-5 es la principal citocina implicada en la infiltración de eosinófilos en las vías respiratorias, por lo tanto no es de extrañar que la reducción de su expresión esté íntimamente ligada a la desaparición del infiltrado eosinofílico. Hasta ahora, las terapias existentes cuya diana era la IL-5 no han generado los resultados esperados. Existen dos anticuerpos humanizados monoclonales específicos de IL-5, mepolizumab y reslizumab, que bloquean la unión de la IL-5 a su receptor. Se han realizado numerosos ensayos clínicos en los que a pesar de disminuirse el número de eosinófilos infiltrados en las vías respiratorias, no se observa una mejoría clínica del paciente asmático [109, 327, 328], permaneciendo invariables los parámetros relacionados con la función pulmonar como son el VEF₁ o el PC₂₀ [329]. En este sentido, se ha visto que la terapia con anti-IL-5 no reduce los depósitos de

proteínas catiónicas de los gránulos de los eosinófilos en las mucosas respiratorias [330]; además debe tenerse en cuenta a la hora de tratar a los pacientes con el anticuerpo monoclonal anti-IL-5, el carácter del componente inflamatorio infiltrado en las vías respiratorias. En muchas ocasiones la inflamación puede ser de tipo no-eosinofílico como es el caso de la inflamación neutrofílica, en cuyo caso suelen ser pacientes resistentes al tratamiento [331].

Nuevos estudios en pacientes asmáticos resistentes a esteroides, donde la eosinofilia en el esputo es persistente, han tenido resultados más positivos, descendiendo el número de exacerbaciones prácticamente a cero al reducirse la presencia de eosinófilos [121, 332, 333]. Estos trabajos resaltan, una vez más, la naturaleza heterogénea del asma; y han incentivado el desarrollo de estrategias dirigidas directamente a la eliminación de los eosinófilos infiltrados en las vías respiratorias, como es el caso del benralizumab, un nuevo anticuerpo monoclonal contra la cadena α del receptor de la IL-5, cuyos resultados parecen ser esperanzadores [334].

Las otras dos citocinas Th2 modificadas tras la terapia, IL-4 e IL-13, también participan activamente en la patología asmática. Por un lado, la IL-4 induce cambio a isotipo IgE en las vías respiratorias, polarizando la respuesta inmune a tipo Th2, y también está implicada en la producción de moco por parte de las células epiteliales. El papel de la IL-13 parece estar más relacionado con un aumento de la hiperreactividad bronquial [335]. Se han realizado muchos esfuerzos en encontrar inhibidores de estas dos citocinas, como ocurre en el caso del anticuerpo monoclonal lebrikizumab anti-IL13 [107]. Recientemente, Kasaian y cols. han publicado un trabajo en el que la terapia con un antagonista para ambas citocinas, IL-4 e IL-13, reduce la inflamación pulmonar, la HRB y la producción de IgE en un modelo animal de asma inducido por OVA [336].

De forma similar, en el presente estudio, la reducción de la expresión de SOCS3 disminuye los niveles de IL-4 e IL-13 en pulmón, dando lugar a una mejoría de la HRB y reduciendo la producción de IgE específica (Tabla 11). En cambio, los niveles de IgE total no se modificaron, lo que refrenda la especificidad del tratamiento con el ARNsi de SOCS3, que sólo actúa revirtiendo la sensibilización específica al antígeno OVA.

La atenuación de la activación de la vía de señalización RhoA/Rho-kinasa (ROCK) enlaza de nuevo con la reducción observada de la pareja de citocinas IL-4 e IL-13 en los ratones asmáticos tras recibir el ARNsi de SOCS3 intranasalmente (Figura 54). En modelos animales de asma alérgica se ha demostrado que la proteína RhoA está implicada en el aumento de la contractilidad del músculo bronquial liso, causante principal de la hiperrespuesta de las vías. La IL-4 y la IL-13 producen un aumento de la expresión de RhoA, a través de STAT6 en el caso de la IL-4, lo que ocasiona la contracción del músculo liso [337-339]. Además recientemente, las proteínas ROCK han sido relacionadas directamente con la regulación de la inflamación alérgica [340]. De hecho, los inhibidores de ROCK han sido utilizados como un potencial tratamiento de la HRB en el asma [341].

DISCUSIÓN

El silenciamiento de SOCS3 a nivel pulmonar en el modelo animal de asma inducido por OVA, disminuye estas dos citocinas, lo que genera un control de la activación de la musculatura lisa vía RhoA/Rho-kinasa, y por lo tanto la HRB.

Además de las citocinas Th2 medidas en el modelo animal, se quiso evaluar las citocinas características del resto de subpoblaciones T. Los niveles de interferon- γ (IFN γ) no se vieron afectados por la terapia de silenciamiento de SOCS3 (Figura 51), este dato corrobora la participación de este supresor fundamentalmente en las respuestas Th2 en detrimento de las respuestas de tipo Th1.

También se ha abordado la variación de los niveles de ARNm de IL-10 e IL-17A (Figura 52) en el modelo de asma alérgica crónica. Los eosinófilos de las vías respiratorias de los pacientes asmáticos, secretan gran cantidad de la citocina IL-17A [342]. Es cierto que tradicionalmente la producción de IL-23 e IL-17A ha sido más relacionada con fenotipos neutrofílicos; pero recientemente, también se ha descrito la activación de un fenotipo eosinófilico inducido por Th2 por parte de estas dos interleucinas en las vías respiratorias de ratones [343]. En el modelo de asma crónica que se desarrolla en el presente trabajo, se obtuvieron niveles elevados de ARNm de IL-17A, que se redujeron significativamente tras el tratamiento con ARNsi de SOCS3. En cambio, la expresión de IL-10 experimentó un efecto contrario, aumentándose gracias a esta reducción de los niveles de SOCS3. Estos resultados apuntan claramente a la actuación de SOCS3 modulando eje regulador IL-10/IL-17.

SOCS3 regula principalmente la vía de señalización JAK-STAT. La deficiencia de SOCS3 en células T cooperadoras provoca la activación de STAT3 de forma constitutiva, dando lugar a la estimulación de la producción de TGF- β y de IL-10 [174]. La administración del ARNsi de SOCS3 en los ratones con asma inducida por OVA disminuyó la fosforilación de STAT3 a la vez que elevó la producción de IL-10.

Esta reducción de la fosforilación es debida probablemente a que la expresión de SOCS3 no se erradica totalmente con la terapia, sino que se recuperan los niveles de expresión existentes en condiciones basales que regulan la activación de la vía JAK/STAT, restableciendo el estado natural de fosforilación del intermediario STAT3, y consiguientemente los niveles de IL-10. Esta hipótesis también ha sido postulada, y demostrada recientemente, por Hausding y cols. en un estudio, en el cual, la inhibición del bucle de activación conformado por STAT-3, STAT-5 y SOCS3, provoca una mejoría de los síntomas en un modelo de asma alérgico experimental, a través de la estimulación del eje regulador [344].

Recientemente Lan y cols. han descrito por primera vez la co-expresión de SOCS3 y FOXP3 en células T reguladoras en la mucosa nasal de pacientes con pólipos nasales [345], en el mismo sentido que en esta tesis se ha descubierto dicha expresión conjunta en los eosinófilos de sangre periférica de pacientes con asma. La presencia de SOCS3 regula negativamente la expresión de FOXP3, a través de la fosforilación de STAT3. Los autores de este artículo postulan a SOCS3 como

una diana potencial para restablecer la expresión de células T reguladoras en pacientes con inflamación persistente en las mucosas. En el modelo de asma crónica, la terapia de silenciamiento génico con SOCS3 aumenta los niveles de IL-10, la citocina principal secretada por las células T reguladoras, confirmando los efectos positivos de la reducción de SOCS3 en la resolución de la inflamación.

El término epigenética se utiliza para describir los cambios heredables en la expresión que no afectan a la secuencia codificante del ADN, como es el caso de las mutaciones. Las modificaciones epigenéticas pueden alterar la estructura del ADN, como ocurre en los procesos de metilación o la estructura de la cromatina a través de la modificación de proteínas como las histonas.

En el asma, el estudio de estos mecanismos es fundamental para profundizar en la etiología y fisiopatología de esta enfermedad; en muchas ocasiones, las modificaciones epigenéticas ayudan a explicar ciertos patrones heredados observados en ciertos grupos de individuos y la interacción con los factores ambientales [346, 347]. Es el caso del establecimiento del asma alérgica, que se acompaña con la polarización hacia un fenotipo Th2, en el que la diferenciación de los linfocitos T depende en parte de la hipometilación de las islas CpG en el promotor del gen de la IL-4, activándose su transcripción[348].

Otro nivel de control epigenético de la expresión génica es el coordinado por los micro ARN (ARNmi). Estos pequeños ARN no-codificantes ejercen una regulación sobre los procesos celulares más importantes y van a actuar como ARN de interferencia en multitud de procesos, tanto en condiciones homeostáticas como patológicas [349, 350]. Además los ARNmi pueden actuar sobre otras modificaciones epigenéticas a través del control de la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas [351].

Consecuentemente se quiso analizar si la terapia con el ARNsi de SOCS3 modificaba el perfil de expresión de micro ARNs (ARNmi) en los pulmones de ratón.

Para abordar este estudio, se decidió recurrir al análisis mediante microarrays, y así obtener información de la regulación que se ejerce a nivel postranscripcional, que es el nivel al que operan estos pequeños ARNs (Tabla 12). Cabe destacar, que dos de los ARNmi cuya expresión se reduce tras el tratamiento con el ARN de silenciamiento de SOCS3 (miR-146b y miR-126), han sido previamente implicados en la enfermedad asmática [352]. La inhibición del miR-126 bloquea la expresión de GATA-3 y por lo tanto el desarrollo correcto de la respuesta inmune Th2, lo que deriva en un menor reclutamiento de eosinófilos en las vías respiratorias y por tanto una reducción de la inflamación, así como la disminución de la HRB y la hipersecreción de moco [353]. Recientemente se ha generado un antagomir para el miR-126 utilizado como terapia en un modelo animal de asma crónica, los resultados positivos obtenidos le sitúan como una nueva diana terapéutica [354].

DISCUSIÓN

La inhibición de la expresión del miR-126 mediante el silenciamiento génico de SOCS en el modelo de asma alérgica crónica refrenda el alto potencial del tratamiento elegido en la presente tesis.

Finalmente, en la figura 56 se resumen todos los procesos en los que participa el silenciamiento de SOCS3 en los pulmones de los ratones con asma alérgica, promoviendo la resolución de proceso crónico. El tratamiento con ARNsi de SOCS3 restablece los niveles naturales de SOCS3, recuperando el control sobre la vía de señalización JAK/STAT y la activación de la respuesta Th2 a través de la modulación de las citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e IL-17, reduciéndose la infiltración en las vías respiratorias de eosinófilos y otras células como los linfocitos T, lo que atenúa el proceso inflamatorio, así como la hipersecreción de moco o los depósitos de colágeno.

La reducción de las IL-4 e IL-13 actúa inhibiendo la vía de señalización RhoA/Rho kinasa en las células musculares lisas de las vías respiratorias, reduciéndose la hiperreactividad bronquial, lo que resulta en una mejoría de la función pulmonar de los ratones.

En conjunto, se consigue la remisión del proceso asmático en los ratones, gracias a la terapia intranasal de silenciamiento génico de SOCS3.

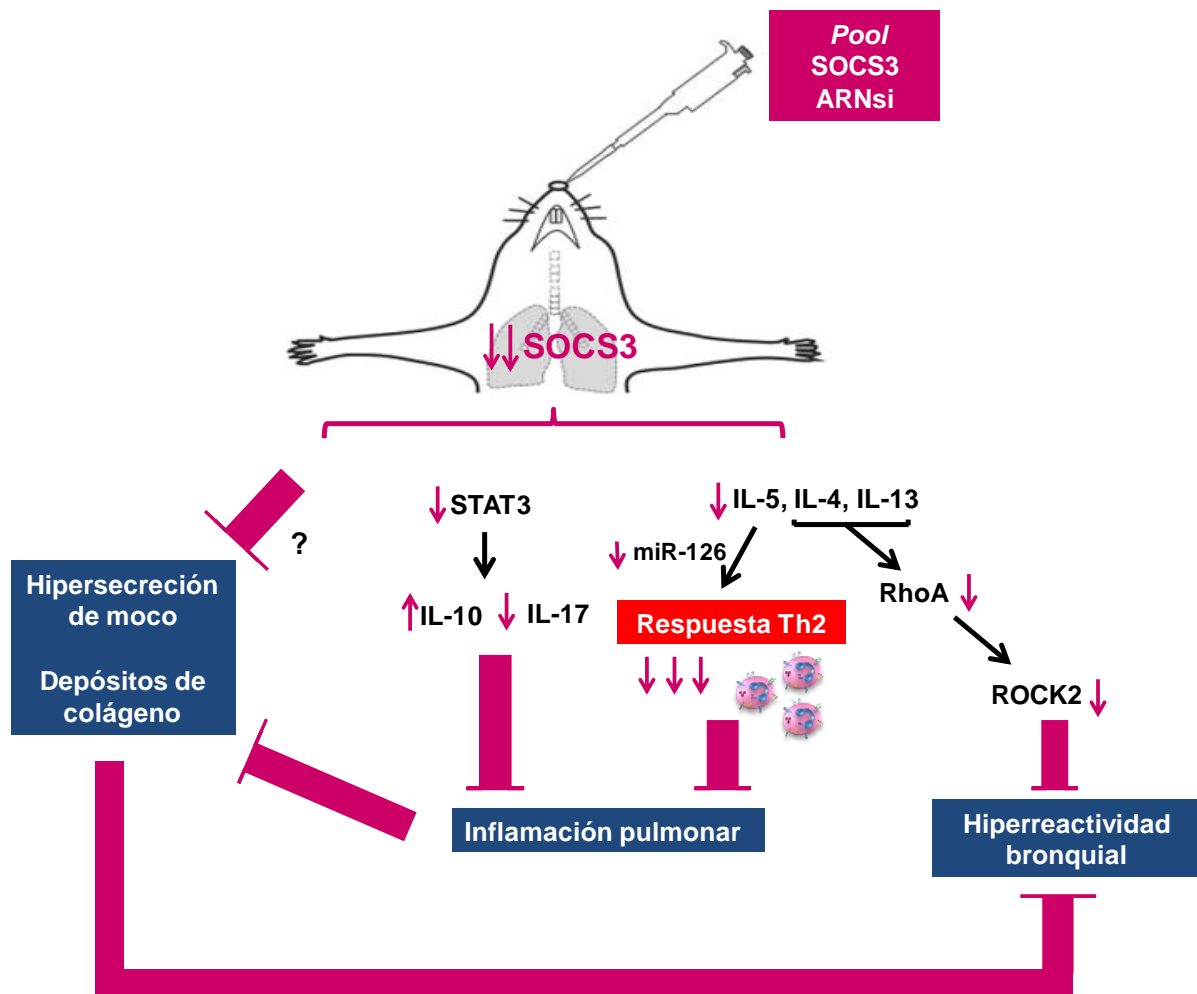


Figura 53. Efecto del silenciamiento génico de SOCS3 mediante terapia intranasal en un modelo de asma alérgica crónica. La reducción de los niveles de SOCS3 en los pulmones de los ratones tratados con el *pool* de ARNsi, provoca la disminución de las citocinas Th2 (IL-4, IL-13 e IL-5) y por lo tanto, la persistencia de dicho fenotipo en los pulmones, lo que conduce a una inhibición del reclutamiento de eosinófilos, y otras células como los linfocitos T, disminuyéndose la inflamación pulmonar y otros procesos regulados por la inmunidad celular como la hipersecreción de moco y la deposición de colágeno. Además la reducción de las IL-4 e IL-13 bloquea la vía de señalización RhoA/Rho kinasa en las células musculares lisas de las vías respiratorias inhibiendo la hiperreactividad bronquial. Por otro lado, el restablecimiento de los niveles naturales de activación de STAT3 genera un aumento de la IL-10 en detrimento de la producción de IL-17, contribuyendo a la atenuación del proceso asmático.

CONCLUSIONES

1. La terapia génica con galectina-3 modifica el perfil de expresión génica en los pulmones de los ratones con asma alérgica crónica, destacando los genes implicados en la regulación negativa de la respuesta inmune: SOCS1, SOCS3 y SOCS5
2. Los eosinófilos humanos purificados de sangre periférica son capaces de transcribir y traducir SOCS3.
3. La expresión de SOCS3 es mayor en eosinófilos de pacientes con asma y BENA en comparación con los eosinófilos procedentes de sujetos sanos. Las citocinas Th2: IL-5, IL-4 e IL-13, así como la PGE₂, regulan la expresión de SOCS3 de forma dosis y tiempo dependiente en eosinófilos humanos purificados de sangre periférica.
4. En las biopsias de esófago de pacientes con EoE la expresión de SOCS3 está aumentada junto con otros genes implicados en las respuestas Th2 como son la IL-5, la IL-13, la eotaxina-3 y su receptor CCR3, posiblemente, gracias a la activación constitutiva de la vía de transducción de señales MAPK/ERK.
5. El silenciamiento génico de SOCS3 en eosinófilos de pacientes asmáticos inhibe la fosforilación de STAT3, disminuye la expresión de los factores de transcripción que controlan tanto la respuesta inmune Th2 como reguladora y reduce la migración y la adhesión de los eosinófilos.
6. La terapia intranasal de silenciamiento génico de SOCS3 en ratones, reduce las características patognomónicas del asma, como son la inflamación, la hiperreactividad bronquial, la fibrosis subepitelial y la hipersecreción de moco.
7. La disminución de los niveles de SOCS3 afecta al perfil de expresión de los micro ARNs en el pulmón de los ratones tratados, destacando la modulación ejercida sobre el miR-126 que a su vez controla la expresión del factor de transcripción máster GATA-3.

Todo ello permite establecer la siguiente conclusión principal:

La reducción de los niveles de SOCS3 es una buena aproximación terapéutica para el tratamiento del asma y otras patologías Th2.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pulendran B, Artis B. New paradigms in type 2 immunity. *Science*, 2012. 337(6093): 431-435.
- [2] Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*, 2012. 18(5): 673-683.
- [3] Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*, 2010. 28: 445-489.
- [4] Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27:485-517.
- [5] Licona-Limon P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*, 2013. 14(6): 536-542.
- [6] Palm NW, Rosenstein RK, Medzhitov R. Allergic host defences. *Nature*, 2012. 484(7395): 465-472.
- [7] McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med*, 1994. 179(4): 1331-1336.
- [8] Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MA, Kool M, Muskens F, Lambrecht BN. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med*, 2010. 207(10): 2097-2111.
- [9] Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, Thorne PS, Will-Karp M, Gioannini TL, Weiss JP, Karp CL. Allergenecity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*, 2009. 457(7229): 585-588.
- [10] Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, Fry T, Schwartzberg PL, Pandey A, Mackall CL, Leonard WJ. A role for thymic stromal lymphopoietin in CD4(+) T cell development. *J Exp Med*, 2004. 200(2): p. 159-168.
- [11] Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med*, 2006. 203(2): 269-273.
- [12] Angkasekwinai P, Park H, Wang YH, Wang YH, Chang SH, Corry DB, Liu YJ, Zhu Z, Dong C. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med*, 2007. 204(7): 1509-1517.
- [13] Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 2005. 23(5): 479-490.
- [14] Sallmann E, Reininger B, Brandt S, Duschek N, Hoflehner E, Garner-Spitzer E, Platzer B, Dehlink E, Hammer M, Holcmann, Oettgen HC, Wiedermann U, Sibilia M, Fiebiger E, Rot A, Maurer D. High-affinity IgE receptors on dendritic cells exacerbate Th2-dependent inflammation. *J Immunol*, 2011. 187(1): 164-171.
- [15] Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol*, 1990. 145(11): p. 3796-3806.
- [16] Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(4): p. 225-235.

- [17] Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem*, 1997. 272(34): 21597-21603.
- [18] Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, Nakanishi K. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 2009. 10(7): 706-712.
- [19] Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie AN. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*, 2010. 464(7293): 1367-1370.
- [20] Wong SH, Walker JA, Jolin HE, Drynan LF, Hams E, Camelo A, Barlow JL, Neill DR, Panova V, Koch U, Radkte F, Hardman CS, Hwang YY, Fallon PG, McKenzie AN. Transcription factor RORalpha is critical for nuocyte development. *Nat Immunol*, 2012. 13(3): 229-236.
- [21] Locksley RM. Asthma and allergic inflammation. *Cell*, 2010. 140(6): 777-783.
- [22] Illi S, Depner M, Genuneit J, Horak E, Loss G, Strunz-Lehner C, Büchele G, Boznanski A, Danielewicz H, Cullinan P, Heederik D, Braun-Fahrlander C, von Mutius E; GABRIELA Study Group. Protection from childhood asthma and allergy in Alpine farm environments-the GABRIEL Advanced Studies. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. 129(6): p. 1470-1477 e6.
- [23] Schaub B, Liu J, Höppler S, Schleich I, Huehn J, Olek S, Wiczorek G, Illi S, von Mutius E. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. 123(4): 774-782 e5.
- [24] Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol*, 1986. 39: 177-253.
- [25] Weller PF. Eosinophils: structure and functions. *Curr Opin Immunol*, 1994. 6(1): 85-90.
- [26] Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med*, 1998. 338(22): 1592-1600.
- [27] Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 111(5): 923-932.
- [28] Venge P. The human eosinophil in inflammation. *Agents Actions*, 1990. 29(1-2): 122-126.
- [29] Rosenberg HF, Domachowske JB. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol*, 2001. 70(5): 691-698.
- [30] Abu-Ghazaleh RI, Fujisawa T, Mestecky J, Kyle RA, Gleich GJ. IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol*, 1989. 142(7): 2393-2400.
- [31] Gounni AS, Lamkhoui B, Ochiai K, Tanaka T, Delaporte E, Capron A, Kinet JP, Capron M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature*, 1994. 367(6459): 183-186.
- [32] Seminario MC, Saini SS, MacGlashan DW Jr, Bochner BS. Intracellular expression and release of Fc epsilon RI alpha by human eosinophils. *J Immunol*, 1999. 162(11): 6893-6900.
- [33] Kita H, Kaneko M, Bartemes KR, Weiler DA, Schimming AW, Reed CE, Gleich GJ. Does IgE bind to and activate eosinophils from patients with allergy?. *J Immunol*, 1999. 162(11): p. 6901-6911.

- [34] Sugiura T, Mabuchi K, Ojima-Uchiyama A, Masuzawa Y, Cheng NN, Fukuda T, Makino S, Waku K. Synthesis and action of PAF in human eosinophils. *J Lipid Mediat*, 1992. 5(2): 151-153.
- [35] Dennis EA, Rhee SG, Billah MM, Hannun YA. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J*, 1991. 5(7): p. 2068-2077.
- [36] Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2013. 13(1): 9-22.
- [37] Okada S, Kita H, George TJ, Gleich GJ, Leiferman KM. Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. 17(4): 519-528.
- [38] Spencer LA, Weller PF. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol*, 2010. 88(3): p. 250-256.
- [39] Del Pozo V, De Andrés B, Martín E, Cárdbaba B, Fernández JC, Gallardo S, Tramón P, Leyva-Cobian F, Palomino P, Lahoz C. Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. *Eur J Immunol*, 1992. 22(7): 1919-1925.
- [40] Padigel UM, Lee JJ, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infect Immun*, 2006. 74(6): 3232-3238.
- [41] Duez C, Dakhama A, Tomkinson A, Marquillies P, Balhorn A, Tonnel AB, Bratton DL, Gelfand EW. Migration and accumulation of eosinophils toward regional lymph nodes after airway allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 114(4): 820-825.
- [42] Shi HZ, Xiao CQ, Li CQ, MO XY, Yang QL, Leng J, Chen YQ. Endobronchial eosinophils preferentially stimulate T helper cell type 2 responses. *Allergy*, 2004. 59(4): 428-435.
- [43] Lucey DR, Nicholson-Weller A, Weller PF. Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(4): p. 1348-1351.
- [44] Celestin J, Rotschke O, Falk K, Ramesh N, Jabara H, Strominger J, Geha RS. IL-3 induces B7.2 (CD86) expression and costimulatory activity in human eosinophils. *J Immunol*, 2001. 167(11): 6097-6104.
- [45] Ohkawara Y, Lim KG, Xing Z, Glibetic M, Nakano K, Dolovich J, Croitoru K, Weller PF, Jordana M. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest*, 1996. 97(7): p. 1761-1766.
- [46] Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA. Instruction of distinct CD4 helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell*, 2004. 117(4): 515-526.
- [47] Radke AL, Reybolds LE, Melo RC, Dvorak AM, Weller PF, Spencer LA. Mature human eosinophils express functional Notch ligands mediating eosinophil autocrine regulation. *Blood*, 2009. 113(13): 3092-3101.
- [48] Kita H, Ohnishi T, Okubo Y, Weiler D, Abrams JS, Gleich GJ. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med*, 1991. 174(3): 745-748.

- [49] Wong DT, Elovic A, Matossian K, Nagura N, McBride J, Chou MY, Gordon JR, Rand TH, Galli SJ, Weller PF. et al., Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming growth factor beta 1. *Blood*, 1991. 78(10): 2702-2707.
- [50] Wong DT, Weller PF, Galli SJ, Elovic A, Rand TH, Gallagher GT, Chiang T, Chou MY, Matossian K, McBride J. Human eosinophils express transforming growth factor alpha. *J Exp Med*, 1990. 172(3): 673-681.
- [51] Levi-Schaffer F, Garbuzenko E, Rubin A, Reich R, Pickholz D, Gillery P, Emonard H, Nagler A, Maquart FA. Human eosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor beta (TGF-beta). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(17): 9660-9665.
- [52] Burgel PR, Lazarus SC, Tam DC, Ueki IF, Atabai K, Birch M, Nadel JA. Human eosinophils induce mucin production in airway epithelial cells via epidermal growth factor receptor activation. *J Immunol*, 2001. 167(10): 5948-5954.
- [53] Puxeddu I, Alian A, Piliponsky AM, Ribatti D, Panet A, Levi-Schaffer F. Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. 37(3): 628-636.
- [54] Kobayashi H, Gleich GJ, Butterfield JH, Kita H. Human eosinophils produce neurotrophins and secrete nerve growth factor on immunologic stimuli. *Blood*, 2002. 99(6): 2214-2220.
- [55] Puxeddu I, Berkman N, Ribatti D, Bader R, Haitchi HM, Davies DE, Howarth PH, Levi-Schaffer F. Osteopontin is expressed and functional in human eosinophils. *Allergy*, 2010. 65(2): 168-174.
- [56] Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: 147-174.
- [57] Nonaka M, Nonaka R, Woolley K, Adelroth E, Miura K, Okhawara Y, Glibetic M, Nakano K, O'Byrne P, Dolovich J. Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils. *J Immunol*, 1995. 155(6): 3234-3244.
- [58] Costa JJ, Matossian K, Resnick MB, Beil WJ, Wong DT, Gordon JR, Dvorak AM, Weller PF, Galli SJ. Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor-alpha and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *J Clin Invest*, 1993. 91(6): 2673-2684.
- [59] Lacy P, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, Hagen SC, Velazquez JR, Man SF, Moqbel R. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils. *Blood*, 1999. 94(1): 23-32.
- [60] Johansson MW, Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN, Mosher DF. Up-regulation and activation of eosinophil integrins in blood and airway after segmental lung antigen challenge. *J Immunol*, 2008. 180(11): 7622-7635.
- [61] Mawhorter SD, Stephany DA, Ottesen EA, Nutman TB. Identification of surface molecules associated with physiologic activation of eosinophils. Application of whole-blood flow cytometry to eosinophils. *J Immunol*, 1996. 156(12): 4851-4858.
- [62] Sillaber C, Geissler K, Scherrer R, Kaltenbrunner R, Bettelheim P, Lechner K, Valent P. Type beta transforming growth factors promote interleukin-3 (IL-3)-dependent differentiation of human basophils but inhibit IL-3-dependent differentiation of human eosinophils. *Blood*, 1992. 80(3): 634-641.

- [63] Fulkerson PC, Zimmermann N, Brandt EB, Muntel EE, Doecker MP, Kavanaugh JL, Mishra A, Witte DP, Zhang H, Farber JM, Yang M, Foster PS, Rothenberg ME. Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN-gamma (Mig, CXCL9). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(7): 1987-1992.
- [64] Zielinski RM, Lawrence WD. Interferon-alpha for the hypereosinophilic syndrome. *Ann Intern Med*, 1990. 113(9): 716-718.
- [65] Nutku E, Aizawa H, Hudson SA, Bochner BS. Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis. *Blood*, 2003. 101(12): 5014-5020.
- [66] McNagny K, Graf T. Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *J Exp Med*, 2002. 195(11): F43-47.
- [67] Takatsu K, Takaki S, Hitoshi Y. Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation. *Adv Immunol*, 1994. 57: 145-190.
- [68] Rothenberg ME, Pomerantz JL, Owen WF Jr, Avraham S, Soberman RJ, Austen KF, Stevens RL. Characterization of a human eosinophil proteoglycan, and augmentation of its biosynthesis and size by interleukin 3, interleukin 5, and granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *J Biol Chem*, 1988. 263(27): 13901-13908.
- [69] Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood*, 1992. 79(12): 3101-3109.
- [70] Mishra A, Hogan SP, Lee JJ, Foster PS, Rothenberg ME. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J Clin Invest*, 1999. 103(12): 1719-1727.
- [71] Robertson SA, Mau VJ, Hudson SN, Tremellen KP. Cytokine-leukocyte networks and the establishment of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 1997. 37(6): 438-442.
- [72] Gouon-Evans V, Rothenberg ME, Pollard JW. Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. *Development*, 2000. 127(11): 2269-2282.
- [73] Throsby M, Herbelin A, Pléau JM, Dardenne M. CD11c+ eosinophils in the murine thymus: developmental regulation and recruitment upon MHC class I-restricted thymocyte deletion. *J Immunol*, 2000. 165(4): 1965-1975.
- [74] Chu VT, Fröhlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, Lee JJ, Löhning M, Berek C. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol*, 2011. 12(2): 151-159.
- [75] Wong CK., Hu S, Cheung PF, Lam CW. Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. 43(3): 305-315.
- [76] Terrier B, Bièche I, Maisonneuve T, Laurendeau I, Rosenzweig M, Kahn JE, Diemert MC, Musset L, Vidaud M, Sène D, Costedoat-Chalumeau N, Le Thi-Huong D, Amoura Z, Klatzmann D, Cacoub P, Saadoun D. Interleukin-25: a cytokine linking eosinophils and adaptive immunity in Churg-Strauss syndrome. *Blood*, 2010. 116(22): 4523-4531.
- [77] Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. 121(6): 1484-1490.
- [78] Bousquet J, Clark TJ, Hurd S, Khaltaev N, Lenfant C, O'Byrne P, Sheffer A. GINA guidelines on asthma and beyond. *Allergy*, 2007. 62(2): 102-112.

- [79] Moffatt MF. Genes in asthma: new genes and new ways. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008. 8(5): 411-417.
- [80] GINA. Global strategy for asthma management and prevention. *Update from NHBL/WHO Workshop Report 1995*. Revised 2012.
- [81] A plea to abandon asthma as a disease concept. *Lancet*, 2006. 368(9537): 705.
- [82] Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med*, 2001. 344(5): 350-362.
- [83] Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. 104(6): 1139-1146.
- [84] Ober C. Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 116(2): 274-278.
- [85] Simpson A., Tan VY, Winn J, Svensén M, Bishop CM, Heckerman DE, Buchan I, Custovic A. Beyond atopy: multiple patterns of sensitization in relation to asthma in a birth cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 181(11): 1200-1206.
- [86] Wark PA., Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, Holgate ST, Davies DE. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med*, 2005. 201(6): 937-947.
- [87] Devries A, Vercelli D. Epigenetics of human asthma and allergy: promises to keep. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2013. 31(3): 183-189.
- [88] Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, Pfister R, Menz G, Robinson DS, Kay AB, Corrigan CJ. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. 154(5): 1497-504.
- [89] Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata L, Durham SR, Pfister R, Menz G, Barkans J, Ying S, Kay AB. High-affinity IgE receptor (FcεpsilonRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. 153(6 Pt 1): 1931-1937.
- [90] Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, Wardlaw AJ, Green RH. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. 178(3): 218-224.
- [91] Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzique E, Heath S, von Mutius E, Farrall M, Lathrop M, Cookson WO; GABRIEL Consortium. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med*, 2010. 363(13): 1211-1221.
- [92] Bisgaard H, Bønnelykke K, Sleiman PM, Brasholt M, Chawes B, Kreiner-Møller E, Stage M, Kim C, Tavendale R, Baty F, Phipps CB, Palmer CN, Hakonarsson H. Chromosome 17q21 gene variants are associated with asthma and exacerbations but not atopy in early childhood. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 179(3): 179-185.
- [93] Slager RE, Hawkins GA, Li X, Postma DS, Meyers DA, Bleecker ER. Genetics of asthma susceptibility and severity. *Clin Chest Med*, 2012. 33(3): 431-443.
- [94] Xiao C, Puddicombe SM, Field S, Haywood J, Broughton-Head V, Puxeddu I, Haitchi HM, Vernon-Wilson E, Sammut D, Bedke N, Cremin C, Sones J, Djukanovic R, Howarth PH, Collins JE, Holgate ST, Monk P, Davies DE. Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. 128(3): 549-56 e1-12.

- [95] Jacquet A.. Interactions of airway epithelium with protease allergens in the allergic response. *Clin Exp Allergy*, 2011. 41(3): 305-311.
- [96] van Panhuys N, Prout M, Forbes E, Min B, Paul WE, Le Gros G. Basophils are the major producers of IL-4 during primary helminth infection. *J Immunol*, 2011. 186(5): 2719-2728.
- [97] Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansei T, Khan M, Bush A. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. 171(10): 1077-1082.
- [98] Kunicka JE, Talle MA, Denhardt GH, Brown M, Prince LA, Goldstein G. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cell Immunol*, 1993. 149(1): 39-49.
- [99] Maneechotesuwan K., Yao X, Ito K, Jazrawi E, Usmani OS, Adcock IM, Barnes PJ. Suppression of GATA-3 nuclear import and phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease. *PLoS Med*, 2009. 6(5): e1000076.
- [100] Takami S, Mizuno T, Oyanagi T, Tadaki H, Suzuki T, Muramatsu K, Takizawa T, Arakawa H. Glucocorticoids inhibit MUC5AC production induced by transforming growth factor-alpha in human respiratory cells. *Allergol Int*, 2012. 61(3): 451-459.
- [101] Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, Koth LL, Arron JR, Fahy JV. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 180(5): 388-395.
- [102] Szeffler SJ, Phillips BR, Martinez FD, Chinchilli VM, Lemanske RF, Strunk RC, Zeiger RS, Larsen G, Spahn JD, Bacharier LB, Bloomberg GR, Guilbert TW, Heldt G, Morgan WJ, Moss MH, Sorkness CA, Taussig LM. Characterization of within-subject responses to fluticasone and montelukast in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 115(2): 233-242.
- [103] Berry M, Morgan A, Shaw DE, Parker D, Green R, Brightling C, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax*, 2007. 62(12): 1043-1049.
- [104] Fahy JV, Fleming HE, Wong HH, Liu JT, Su JQ, Reimann J, Fick RB Jr, Boushey HA. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. 155(6): 1828-1834.
- [105] Gauvreau GM, Boulet LP, Cockcroft DW, Fitzgerald JM, Carlsten C, Davis BE, Deschesnes F, Duong M, Durn BL, Howie KJ, Hui L, Kasaian MT, Killian KJ, Strinich TX, Watson RM, Y N, Zhou S, Raible D, O'Byrne PM. Effects of interleukin-13 blockade on allergen-induced airway responses in mild atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. 183(8): 1007-1014.
- [106] Wenzel S, Wilbraham D, Fuller R, Getz EB, Longphre M. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet*, 2007. 370(9596): 1422-1431.
- [107] Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR, Harris JM, Scheerens H, Wu LC, Su Z, Mosesova S, Eisner MD, Bohen SP, Matthews JG. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med*, 2011. 365(12): 1088-1098.

- [108] Slager RE, Hawkins GA, Ampleford EJ, Bowden A, Stevens LE, Morton MT, Tomkinson A, Wenzel SE, Longphre M, Bleecker ER, Meyers DA. IL-4 receptor alpha polymorphisms are predictors of a pharmacogenetic response to a novel IL-4/IL-13 antagonist. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 126(4): 875-878.
- [109] Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*, 2000. 356(9248): 2144-2148.
- [110] Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113(1): 101-108.
- [111] Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, D'Agostino R Jr, Castro M, Curran-Everett D, Fitzpatrick AM, Gaston B, Jarjour NN, Sorkness R, Calhoun WJ, Chung KF, Comhair SA, Dweik RA, Israel E, Peters SP, Busse WW, Erzurum SC, Bleecker ER; National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 181(4): 315-323.
- [112] Hoshino T, Kato S, Oka N, Imaoka T, Kinoshita T, Takei S, Kitasato Y, Kawayama T, Imaizumi T, Yamada K, Young HA, Aizawa H. Pulmonary inflammation and emphysema: role of the cytokines IL-18 and IL-13. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. 176(1): 49-62.
- [113] Lajoie S, Lewkowich IP, Suzuki Y, Clark JR, Sproles AA, Dienger K, Budelsky AL, Wills-Karp M. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nat Immunol*, 2010. 11(10): 928-935.
- [114] Eiwegger T, Akdis CA. IL-33 links tissue cells, dendritic cells and Th2 cell development in a mouse model of asthma. *Eur J Immunol*, 2011. 41(6): 1535-1538.
- [115] Saha SK., Berry MA, Parker D, Siddiqui S, Morgan A, May R, Monk P, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID, Brightling CE. Increased sputum and bronchial biopsy IL-13 expression in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. 121(3): 685-691.
- [116] Bachert C, Wagenmann M, Hauser U, Rudack C. IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue. *J Allergy Clin Immunol*, 1997. 99(6 Pt 1): 837-842.
- [117] Chu HW, Balzar S, Westcott JY, Trudeau JB, Sun Y, Conrad DJ, Wenzel SE. Expression and activation of 15-lipoxygenase pathway in severe asthma: relationship to eosinophilic phenotype and collagen deposition. *Clin Exp Allergy*, 2002. 32(11): 1558-1565.
- [118] Yamamoto M, Tochino Y, Chibana K, Trudeau JB, Holquin F, Wenzel SE. Nitric oxide and related enzymes in asthma: relation to severity, enzyme function and inflammation. *Clin Exp Allergy*, 2012. 42(5): 760-768.
- [119] Stirling RG, Kharitonov SA, Campbell D, Robinson DS, Durham SR, Chung KF, Barnes PJ. Increase in exhaled nitric oxide levels in patients with difficult asthma and correlation with symptoms and disease severity despite treatment with oral and inhaled corticosteroids. Asthma and Allergy Group. *Thorax*, 1998. 53(12): 1030-1034.

- [120] Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, Marshall RP, Bradding P, Green RH, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med*, 2009. 360(10): 973-984.
- [121] Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E, Hargreave FE, O'Byrne PM. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med*, 2009. 360(10): 985-993.
- [122] Lugogo NL, Kraft M, Dixon AE. Does obesity produce a distinct asthma phenotype?. *J Appl Physiol (1985)*, 2010. 108(3): 729-734.
- [123] Dixon AE, Pratley RE, Forgione PM, Kaminsky DA, Whittaker-Leclair LA, Griffes LA, Garudathri J, Raymond D, Poynter ME, Bunn JY, Irvin CG. Effects of obesity and bariatric surgery on airway hyperresponsiveness, asthma control, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. 128(3): 508-515 e1-2.
- [124] Simpson JL, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. 172(5): 559-565.
- [125] Gupta S, Siddiqui S, Haldar P, Raj JV, Entwisle JJ, Wardlaw AJ, Bradding P, Pavord ID, Green RH, Brightling CE. Qualitative analysis of high-resolution CT scans in severe asthma. *Chest*, 2009. 136(6): 1521-1528.
- [126] Busacker A., Newell JD Jr, Keefe T, Hoffman EA, Granroth JC, Castro M, Fain S, Wenzel S. A multivariate analysis of risk factors for the air-trapping asthmatic phenotype as measured by quantitative CT analysis. *Chest*, 2009. 135(1): 48-56.
- [127] Kato T, Takeda Y, Nakada T, Sendo F. Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. *Nat Immun*, 1995. 14(4): 198-208.
- [128] Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. 177(2): 148-155.
- [129] McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, Loqar A, Henry A, Irvin CG, Piganelli JD, Ray A, Jolls JK. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol*, 2008. 181(6): 4089-4097.
- [130] Gibson PG, Gibson PG, Dolovich J, Denburg J, Ramsdale EH, Hargreave FE. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma. *Lancet*, 1989. 1(8651): 1346-1348.
- [131] Fujimura M, Ogawa H, Yasui M, Matsuda T. Eosinophilic tracheobronchitis and airway cough hypersensitivity in chronic non-productive cough. *Clin Exp Allergy*, 2000. 30(1): 41-47.
- [132] Lemiere C, Efthimiadis A, Hargreave FE. Occupational eosinophilic bronchitis without asthma: an unknown occupational airway disease. *J Allergy Clin Immunol*, 1997. 100(6 Pt 1): 852-853.
- [133] Gibson PG, Fujimura M, Niimi A, Eosinophilic bronchitis: clinical manifestations and implications for treatment. *Thorax*, 2002. 57(2): 178-182.
- [134] Sastre B, Fernández-Nieto M, Mollá R, López E, Lahoz C, Sastre J, del Pozo V, Quirce S. Increased prostaglandin E2 levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis. *Allergy*, 2008. 63(1): 58-66.

- [135] Liacouras CA., Furuta GT, Hirano I, Atkins D, Attwood SE, Bonis PA, Burks AW, Chehade M, Collins MH, Dellon ES, Dohil R, Falk GW, Gonsalves N, Gupta SK, Katzka DA, Lucendo AJ, Markowitz JE, Noel RJ, Odze RD, Putnam PE, Richter JE, Romero Y, Ruchelli E, Sampson HA, Schoepfer A, Shaheen NJ, Sicherer SH, Spechler S, Spergel JM, Straumann A, Weshill BK, Rothenberg ME, Aceves SS. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. 128(1): 3-20 e6; quiz 21-2.
- [136] Chehade M, Aceves SS. Food allergy and eosinophilic esophagitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2010. 10(3): 231-237.
- [137] Moawad FJ, Veerappan GR, Lake JM, Maydonovitch CL, Haymore BR, Kosisky SE, Wong RK. Correlation between eosinophilic oesophagitis and aeroallergens. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010. 31(4): 509-515.
- [138] Straumann A., Aceves SS, Blanchard C, Collins MH, Furuta GT, Hirano I, Schoepfer Am, Simon D, Simon HU. Pediatric and adult eosinophilic esophagitis: similarities and differences. *Allergy*, 2012. 67(4): 477-490.
- [139] Blanchard C, Stucke EM, Rodriguez-Jimenez B, Burwinkel K, Collins MH, Ahrens A, Alexander ES, Butz BK, Jameson SC, Kaul A, Franciosi JP, Kushner JP, Putnam PE, Abonia JP, Rothenberg ME. A striking local esophageal cytokine expression profile in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. 127(1): 208-217.
- [140] Garrett JK., Jameson SC, Thomson B, Collins MH, Wagoner LE, Freese DK, Beck LA, Boyce JA, Filipovich AH, Villanueva JM, Sutton SA, Assa'ad AH, Rothenberg ME. Anti-interleukin-5 (mepolizumab) therapy for hypereosinophilic syndromes. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113(1): 115-119.
- [141] Blanchard C, Wang N, Stringer KF, Mishra A, Fulkerson PC, Abonia JP, Jameson SC, Kirby C, Konikoff MR, Collins MH, Cohen MB, Akers R, Hogan SP, Assa'ad AH, Putnam PE, Aronow BJ, Rothenberg ME. Eotaxin-3 and a uniquely conserved gene-expression profile in eosinophilic esophagitis. *J Clin Invest*, 2006. 116(2): 536-547.
- [142] Sherrill JD, Gao PS, Stucke EM, Blanchard C, Collins MH, Putnam PE, Franciosi JP, Kushner JP, Abonia JP, Assa'ad AH, Kovacic MB, Biagini Myers JM, bochner BS, He H, Hershey GK, Martin LJ, Rothenberg ME. Variants of thymic stromal lymphopoietin and its receptor associate with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 126(1): 160-165 e3.
- [143] Dias PM, Banerjee G. The role of Th17/IL-17 on eosinophilic inflammation. *J Autoimmun*, 2013. 40: 9-20.
- [144] Lucendo A.J, De Rezende L, Comas C, Caballero T, Bellón T. Treatment with topical steroids downregulates IL-5, eotaxin-1/CCL11, and eotaxin-3/CCL26 gene expression in eosinophilic esophagitis. *Am J Gastroenterol*, 2008. 103(9): 2184-2193.
- [145] Straumann A., Conus S, Grzonka P, Kita H, Kephart G, Bussmann C, Beglinger C, Smith DA, Patel J, Byrne M, Simon HU. Anti-interleukin-5 antibody treatment (mepolizumab) in active eosinophilic oesophagitis: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Gut*, 2010. 59(1): 21-30.

- [146] Assa'ad AH, Gupta SK, Collins MH, Thomson M, Heath AT, Smith DA, Perschy TL, Jurgensen CH, Ortega HG, Aceves SS. An antibody against IL-5 reduces numbers of esophageal intraepithelial eosinophils in children with eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology*, 2011. 141(5): p. 1593-1604.
- [147] Abonia JP, Putnam PE. Mepolizumab in eosinophilic disorders. *Expert Rev Clin Immunol*, 2011. 7(4): 411-417.
- [148] Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: 293-322.
- [149] Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 1997. 387(6636): 924-929.
- [150] Endo TA., Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 1997. 387(6636): 921-924.
- [151] Yoshimura A., Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(6): 454-465.
- [152] Babon JJ, McManus EJ, Yao S, DeSouza DP, Mielke LA, Sprigg NS, Willson TA, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M, Nicholson SE, Norton RS. The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Mol Cell*, 2006. 22(2): 205-216.
- [153] Babon JJ, Kershaw NJ, Murphy JM, Varghese LN, Laktyushin A, Young SN, Lucet IS, Norton RS, Nicola NA. Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity. *Immunity*, 2012. 36(2): 239-250.
- [154] Babon JJ, Sabo JK, Zhang JG, Nicola NA, Norton RS. The SOCS box encodes a hierarchy of affinities for Cullin5: implications for ubiquitin ligase formation and cytokine signalling suppression. *J Mol Biol*, 2009. 387(1): 162-174.
- [155] Alexander WS. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(6): 410-416.
- [156] Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K, Cacalano N, O'Garra A, Oshida T, Saito H, Hohnston JA, Yoshimura A, Kubo M. SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. *Nat Med*, 2003. 9(8): 1047-1054.
- [157] Mooney RA, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, Shang Y, Furlanetto RW. et al., Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem*, 2001. 276(28): 25889-25893.
- [158] Sasaki A., Inagaki-Ohara K, Yoshida T, Yamanaka A, Sasaki M, Yasukawa H, Koromilas AE, Yoshimura A. The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6. *J Biol Chem*, 2003. 278(4): 2432-2436.

- [159] Haan S, Ferguson P, Sommer U, Hiremath M, McVicar DW, Heinrich PC, Johnston JA, Cacalano NA. Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation. *J Biol Chem*, 2003. 278(34): 31972-31979.
- [160] Peltola KJ, Paukku K, Aho TL, Ruuska M, Silvennoinen O, Koskinen PJ. Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood*, 2004. 103(10): 3744-3750.
- [161] Hwang MN, Min CH, Kim HS, Lee H, Yoon KA, Park SY, Lee ES, Yoon S. The nuclear localization of SOCS6 requires the N-terminal region and negatively regulates Stat3 protein levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 360(2): 333-338.
- [162] Vuong BQ, Arenzana TL, Showalter BM, Losman J, Chen XP, Mostecky J, Banks AS, Limnander A, Fernandez N, Rothman PB. SOCS-1 localizes to the microtubule organizing complex-associated 20S proteasome. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(20): 9092-9101.
- [163] Piessevaux J, Lavens D, Montoye T, Wauman J, Catteeuw D, Vandekerckhove J, Belsham D, Peelman F, Tavernier J. et al., *Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling*. *J Biol Chem*, 2006. 281(44): p. 32953-66.
- [164] Takahashi Y, Carpino N, Cross JC, Torres M, Parganas E, Ihle JN. SOCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. *EMBO J*, 2003. 22(3): 372-384.
- [165] Bjorbak C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers MG Jr. et al., *SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985*. *J Biol Chem*, 2000. 275(51): 40649-40657.
- [166] Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem*, 2000. 275(17): 12848-12856.
- [167] Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol*, 2003. 4(6): 551-556.
- [168] Cacalano NA, Sanden D, Johnston JA. Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nat Cell Biol*, 2001. 3(5): 460-465.
- [169] Li Y, Chu N, Rostami A, Zhang GX. Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J Immunol*, 2006. 177(3): 1679-1688.
- [170] Rønn SG, Börjesson A, Brunn C, Heding PE, Frobøse H, Mandrup-Poulsen T, Karslen AE, Rasschaert J, Sandler S, Billestrup N. Suppressor of cytokine signalling-3 expression inhibits cytokine-mediated destruction of primary mouse and rat pancreatic islets and delays allograft rejection. *Diabetologia*, 2008. 51(10): 1873-1882.
- [171] Chen YH, Hsieh SC, Chen WY, Li KJ, Wu CH, Wu PC, Tsai CY, Yu CL. Spontaneous resolution of acute gouty arthritis is associated with rapid induction of the anti-inflammatory factors TGFbeta1, IL-10 and soluble TNF receptors and the intracellular cytokine negative regulators CIS and SOCS3. *Ann Rheum Dis*, 2011. 70(9): 1655-1663.

- [172] Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*, 2011. 89(4): 557-563.
- [173] Nakaya M, Hamano S, Kawasumi M, Yoshida H, Yoshimura A, Kobayashi T. Aberrant IL-4 production by SOCS3-over-expressing T cells during infection with *Leishmania major* exacerbates disease manifestations. *Int Immunol*, 2011. 23(3): 195-202.
- [174] Kinjyo I, Inoue H, Hamano S, Fukuyama S, Yoshimura T, Koga K, Takaki H, Himeno K, Takaesu G, Kobayashi T, Yoshimura A. Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J Exp Med*, 2006. 203(4): 1021-1031.
- [175] Moriwaki A, Inoue H, Nakano T, Matsunaga Y, Matsuno Y, Matsumoto T, Fukuyama S, Kan-O K, Matsumoto K, Tsuda-Eguchi M, Nagakubo D, Yoshie O, Yoshimura A, Kubo M, Nakanishi Y. T cell treatment with small interfering RNA for suppressor of cytokine signaling 3 modulates allergic airway responses in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. 44(4): 448-455.
- [176] Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, Yoshimura A, Hennighausen L, O'Shea JJ. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(21): 8137-8142.
- [177] Taleb S, Romain M, Ramkhalawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, Esposito B, Perez N, Yasukawa H, Van Snick J, Yoshimura A, Tedqui A, Mallat Z. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med*, 2009. 206(10): 2067-2077.
- [178] Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. 31(5): 980-985.
- [179] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993. 75(5): 843-854.
- [180] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998. 391(6669): 806-811.
- [181] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001. 411(6836): 494-498.
- [182] Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys*, 2013. 42: 217-239.
- [183] Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(45): 17719-17724.
- [184] Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*, 2007. 26(3): 775-783.
- [185] McAnuff MA, Rettig GR, Rice KG. Potency of siRNA versus shRNA mediated knockdown in vivo. *J Pharm Sci*, 2007. 96(11): 2922-2930.
- [186] Robbins M, Judge A, MacLachlan I. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides*, 2009. 19(2): 89-102.

- [187] Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther*, 2006. 13(3): 494-505.
- [188] Rosas-Taraco AG, Higgins DM, Sánchez-Campillo J, Lee EJ, Orme IM, González-Juarrero M. Intrapulmonary delivery of XCL1-targeting small interfering RNA in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. 41(2): 136-145.
- [189] Garbuzenko OB, Saad M, Betigeri S, Zhang M, Vetcher AA, Soldatenkov VA, Reimer DC, Pozharov VP, Minko T. Intratracheal versus intravenous liposomal delivery of siRNA, antisense oligonucleotides and anticancer drug. *Pharm Res*, 2009. 26(2): 382-394.
- [190] Moschos SA, Jones SW, Perry MM, Williams AE, Erjefalt JS, Turner JJ, Barnes PJ, Sproat BS, Gait MJ, Lindsay MA. Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjug Chem*, 2007. 18(5): 1450-1459.
- [191] Fulton A, Peters ST, Perkins GA, Jarosinski KW, Damiani A, Brosnahan M, Buckles EL, Osterrieder N, Van de Walle GR. Effective treatment of respiratory alphaherpesvirus infection using RNA interference. *PLoS One*, 2009. 4(1): p. e4118.
- [192] Li BJ, Tang Q, Cheng D, Qin C, Xie FY, Wei Q, Xu J, Liu Y, Zheng BJ, Woodle MC, Zhong N, Lu PY. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med*, 2005. 11(9): 944-951.
- [193] Senoo T, Hattori N, Tanimoto T, Furonaka M, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Yokoyama A, Kohno N. Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax*, 2010. 65(4): 334-340.
- [194] Gutbier B, Kube SM, Reppe K, Santel A, Lange C, Kaufmann J, Suttorp N, Witzenrath M. RNAi-mediated suppression of constitutive pulmonary gene expression by small interfering RNA in mice. *Pulm Pharmacol Ther*, 2010. 23(4): 334-344.
- [195] Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med*, 2005. 11(1): 50-55.
- [196] Bonifazi P, D'Angelo C, Zagarella S, Zelante T, Bozza S, De Luca A, Giovannini G, Moretti S, Iannitti RG, Fallarino F, Carvalho A, Cunha C, Bistoni F, Romani L. Intranasally delivered siRNA targeting PI3K/Akt/mTOR inflammatory pathways protects from aspergillosis. *Mucosal Immunol*, 2010. 3(2): 193-205.
- [197] Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(23): 8682-8686.
- [198] Sanders N, Rudolph C, Braeckmans K, De Smedt SC, Demeester J. Extracellular barriers in respiratory gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. 61(2): 115-127.
- [199] Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev*, 2006. 58(1): 32-45.
- [200] DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, Meyers R, Gollob J, Vaishnaw A. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(19): 8800-8805.

- [201] Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM. Asma Volumen I. Ciencia básica y patogenia. Capítulo 13: Bronquitis Eosinofílica. *MRA ediciones*, 2004. 221-226.
- [202] Goplen N, Gorska MM, Stafford SJ, Rozario S, Guo L, Liang Q, Alam R. A phosphosite screen identifies autocrine TGF-beta-driven activation of protein kinase R as a survival-limiting factor for eosinophils. *J Immunol*, 2008. 180(6): 4256-4264.
- [203] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25(4): 402-408.
- [204] Vaquerizas JM, Conde L, Yankilevich P, Cabezón A, Minguez P, Díaz-Uriarte, Al-Shahrour F, Herrero J, Dopazo J. GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(Web Server issue): W616-620.
- [205] Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 2003. 19(2): 185-193.
- [206] Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Boldstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, 2004. 5(10): R80.
- [207] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the royal statistical society B*, 1995. 57(1): 289-300.
- [208] Al-Shahrour F, Arbiza L, Dopazo H, Huerta-Cepas J, Mínguez P, Montaner D, Dopazo J. From genes to functional classes in the study of biological systems. *BMC Bioinformatics*, 2007. 8: 114.
- [209] Lopez E, del Pozo V, Miguel T, Sastre B, Seoane C, Civantos E, Llanes E, Baeza ML, Palomino P, Cárdbaba B, Gallardo S, Manzarbeitia F, Zubeldia JM, Lahoz C. Inhibition of chronic airway inflammation and remodeling by galectin-3 gene therapy in a murine model. *J Immunol*, 2006. 176(3): 1943-1950.
- [210] Cortegano I, del Pozo V, Cárdbaba B, de Andrés B, Gallardo S, del Amo A, Arrieta I, Jurado A, Palomino P, Liu FT, Lahoz C. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol*, 1998. 161(1): 385-389.
- [211] Zon LI, Yamaguchi Y, Yee K, Albee EA, Kimura A, Bennett JC, Orkin SH, Ackerman SJ. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood*, 1993. 81(12): 3234-3241.
- [212] Lopez E, Zafra MP, Sastre B, Gámez C, Fernández-Nieto M, Sastre J, Lahoz C, Quirce S, Del Pozo V. Suppressors of cytokine signaling 3 expression in eosinophils: regulation by PGE(2) and Th2 cytokines. *Clin Dev Immunol*, 2011. 2011: 917015.
- [213] Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*, 2012. 18(5): 716-725.
- [214] Martinez FD, Vercelli D. Asthma. *Lancet*, 2013. 382(9901): 1360-1372.
- [215] Kubo M, Inoue H. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in Th2 cells evokes Th2 cytokines, IgE, and eosinophilia. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2006. 6(1): 32-39.

- [216] Gritzmacher CA, Robertson MW, Liu FT. IgE-binding protein. Subcellular location and gene expression in many murine tissues and cells. *J Immunol*, 1988. 141(8): 2801-2806.
- [217] Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?. *Trends Immunol*, 2002. 23(6): 313-320.
- [218] Cortegano I, Pozo V, Cárda B, Arrieta I, Gallardo S, Rojo M, Aceituno E, Takai T, Verbeek S, Palomino P, Liu FT, Lahoz C. Interaction between galectin-3 and FcγRIII induces down-regulation of IL-5 gene: implication of the promoter sequence IL-5REIII. *Glycobiology*, 2000. 10(3): 237-242.
- [219] Frigeri LG, Zuberi RI, Liu FT. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. *Biochemistry*, 1993. 32(30): 7644-7649.
- [220] Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: 503-529.
- [221] Egwuagu CE, Yu CR, Zhang Mahdi RM, Kim SJ, Gery I. Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol*, 2002. 168(7): 3181-3187.
- [222] Arakawa S, Hatano Y, Katagiri K. Differential expression of mRNA for Th1 and Th2 cytokine-associated transcription factors and suppressors of cytokine signalling in peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol*, 2004. 135(3): 505-510.
- [223] Palme DC, Restifo NP. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol*, 2009. 30(12): 592-602.
- [224] Qin H, Holdbrooks AT, Liu Y, Reynolds SL, Yanagisawa LL, Benveniste EN. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *J Immunol*, 2012. 189(7): 3439-3448.
- [225] Matsumura Y, Kobayashi T, Ichiyama K, Yoshida R, Hashimoto M, Takimoto T, Tanaka K, Chinen T, Shichita T, Wyss-Coray T, Sato K, Yoshimura A. Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *J Immunol*, 2007. 179(4): 2170-2179.
- [226] Nakaya M, Hashimoto M, Nakagawa R, Wakabayashi Y, Ishizaki T, Takada I, Komai K, Yoshida H, Yoshimura A. SOCS3 in T and NKT cells negatively regulates cytokine production and ameliorates ConA-induced hepatitis. *J Immunol*, 2009. 183(11): 7047-7053.
- [227] Brightling CE. Chronic cough due to nonasthmatic eosinophilic bronchitis: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 2006. 129(1 Suppl): 116S-121S.
- [228] Sastre B, Fernández-Nieto M, López E, Gámez C, Aguado E, Quirce S, del Pozo V, Sastre J. PGE(2) decreases muscle cell proliferation in patients with non-asthmatic eosinophilic bronchitis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2011. 95(1-4): 11-18.
- [229] van Rhijn BD, Verheij J, Smout AJ, Bredenoord AJ. Rapidly increasing incidence of eosinophilic esophagitis in a large cohort. *Neurogastroenterol Motil*, 2013. 25(1): 47-52 e5.

- [230] Liacouras CA, Spergel JM, Ruchelli E, Verma R, Mascarenhas M, Semeao E, Flick J, Kelly J, Brown-Whitehorn T, Mamula P, Markowitz JE. Eosinophilic esophagitis: a 10-year experience in 381 children. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2005. 3(12): 1198-1206.
- [231] Baxi S, Gupta SK, Swigonski N, Fitzgerald JF. Clinical presentation of patients with eosinophilic inflammation of the esophagus. *Gastrointest Endosc*, 2006. 64(4): 473-478.
- [232] Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 111(2): 227-242; quiz 243.
- [233] Brown-Whitehorn TF, Spergel JM. The link between allergies and eosinophilic esophagitis: implications for management strategies. *Expert Rev Clin Immunol*, 2010. 6(1): 101-109.
- [234] Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, Rothenberg ME. IL-5 promotes eosinophil trafficking to the esophagus. *J Immunol*, 2002. 168(5): 2464-2469.
- [235] Mishra A, Wang M, Pemmaraju VR, Collins MH, Fulkerson PC, Abonia JP, Blanchard C, Putnam PE, Rothenberg ME. Esophageal remodeling develops as a consequence of tissue specific IL-5-induced eosinophilia. *Gastroenterology*, 2008. 134(1): 204-214.
- [236] Noel RJ, Putnam PE, Rothenberg ME. Eosinophilic esophagitis. *N Engl J Med*, 2004. 351(9): 940-941.
- [237] Blanchard C, Mingler MK, Vicario M, Abonia JP, Wu YY, Lu TX, Collins MH, Putnam PE, Wells SI, Rothenberg ME. IL-13 involvement in eosinophilic esophagitis: transcriptome analysis and reversibility with glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 120(6): 1292-1300.
- [238] Kampen GT, Stafford S, Adachi T, Jinquan T, Quan S, Grant JA, Skov PS, Poulsen LK, Alam R. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood*, 2000. 95(6): 1911-1917.
- [239] Pintucci G, Moscatelli D, Saponara F, Biernacki PR, Baumann FG, Bizekis C, Galloway AC, Basilico C, Mignatti P. Lack of ERK activation and cell migration in FGF-2-deficient endothelial cells. *FASEB J*, 2002. 16(6): 598-600.
- [240] Sands WA, Woolson HD, Milne GR, Rutherford C, Palmer TM. Exchange protein activated by cyclic AMP (Epac)-mediated induction of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in vascular endothelial cells. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(17): 6333-6346.
- [241] Borland G, Bird RJ, Palmer TM, Yarwood SJ. Activation of protein kinase Calpha by EPAC1 is required for the ERK- and CCAAT/enhancer-binding protein beta-dependent induction of the SOCS-3 gene by cyclic AMP in COS1 cells. *J Biol Chem*, 2009. 284(26): 17391-17403.
- [242] Spergel JM, Rothenberg ME, Collins MH, Furuta GT, Markowitz JE, Fuchs G 3rd, O'Gorman MA, Abonia JP, young J, Henkel T, Wilkins HJ, Liacouras CA. Reslizumab in children and adolescents with eosinophilic esophagitis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. 129(2): 456-463, 463 e1-3.
- [243] Kelly KJ, Lazenby AJ, Rowe PC, Yardley JH, Perman JA, Sampson HA. Eosinophilic esophagitis attributed to gastroesophageal reflux: improvement with an amino acid-based formula. *Gastroenterology*, 1995. 109(5): 1503-1512.

- [244] Kanhere A, Hertweck A, Bhatia U, Gökmen MR, Perucha E, Jackson I, Lord GM, Jenner RG. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat Commun*, 2012. 3: 1268.
- [245] Yoshimura A., Suzuki M, Sakaguchi R, Hanada T, Yasukawa H. SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. *Front Immunol*, 2012. 3: 20.
- [246] Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 2008. 118(11): 3546-3556.
- [247] Figueiredo CA, Rodrigues LC, Alcantara-Neves NM, Cooper PJ, Amorim LD, Silva NB, Cruz AA, Barreto ML. Does IFN-gamma play a role on the pathogenesis of non-atopic asthma in Latin America children?. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2012. 8(1): 18.
- [248] Brand S, Teich R, Dicke T, Harb H, Yildirim AÖ, Tost J, Schneider-Stock R, Waterland RA, Bauer UM, von Mutius E, Garn H, Pfefferle PI, Renz H. Epigenetic regulation in murine offspring as a novel mechanism for transmaternal asthma protection induced by microbes. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. 128(3): 618-625 e1-7.
- [249] Curlew JD, Tam SP, Lau P, Kusters DH, Barclay JL, Anderson ST, Waters MJ. A prostaglandin f(2alpha) analog induces suppressors of cytokine signaling-3 expression in the corpus luteum of the pregnant rat: a potential new mechanism in luteolysis. *Endocrinology*, 2002. 143(10): 3984-3993.
- [250] Barclay JL, Anderson ST, Waters MJ, Curlew JD. Characterization of the SOCS3 promoter response to prostaglandin E2 in T47D cells. *Mol Endocrinol*, 2007. 21(10): 2516-2528.
- [251] Gasperini S, Crepaldi L, Calzetti F, Gatto L, Berlato C, Bazzoni F, Yoshimura A, Cassatella MA. Interleukin-10 and cAMP-elevating agents cooperate to induce suppressor of cytokine signaling-3 via a protein kinase A-independent signal. *Eur Cytokine Netw*, 2002. 13(1): 47-53.
- [252] Musacchio T, Torchilin VP. siRNA delivery: from basics to therapeutic applications. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2013. 18: 58-79.
- [253] Schwanhauser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 2011. 473(7347): 337-342.
- [254] Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN, Farber CR, Sinsheimer J, Kang HM, Furlotte N, Park CC, Wenz PZ, Brewer H, Weitz K, Camp DG 2nd, Pan C, Yordanova R, Neuhaus I, Tilford C, Siemers N, Gargalovic P, Eskin E, Kirchgesner T, Smith RD, Lusis AJ. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet*, 2011. 7(6): e1001393.
- [255] Brender C, Nielsen M, Kaltoft K, Mikkelsen G, Zhang Q, Wasik M, Billestrup N, Odum N. STAT3-mediated constitutive expression of SOCS-3 in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, 2001. 97(4): 1056-1062.
- [256] Marine JC, McKay C, Wang D, Topham DJ, Parganas E, Nakajima H, Pandeville H, Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A, Ihle JN. SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell*, 1999. 98(5): 617-627.

- [257] Roberts AW, Robb L, Rakar S, Hartley L, Cluse L, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Alexander WS. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(16): 9324-9329.
- [258] Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling by the SOCS and Spred family proteins. *Keio J Med*, 2009. 58(2): 73-83.
- [259] Trujillo JI. MEK inhibitors: a patent review 2008 - 2010. *Expert Opin Ther Pat*, 2011. 21(7): 1045-1069.
- [260] Gerthoffer WT, Singer CA. MAPK regulation of gene expression in airway smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol*, 2003. 137(2-3): 237-250.
- [261] Duan W, Wong WS. Targeting mitogen-activated protein kinases for asthma. *Curr Drug Targets*, 2006. 7(6): 691-698.
- [262] Bates ME, Sedgwick JB, Zhu Y, Liu LY, Heuser RG, Jarjour NN, Kita H, Bertics PJ. Human airway eosinophils respond to chemoattractants with greater eosinophil-derived neurotoxin release, adherence to fibronectin, and activation of the Ras-ERK pathway when compared with blood eosinophils. *J Immunol*, 2010. 184(12): 7125-7133.
- [263] Shin MH, Lee YA, Bae YS, Kita H, Kim Y, Ryu SH. The synthetic chemoattractant peptide WKYVMm induces superoxide production by human eosinophils via the phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of ERK1/2. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005. 137 Suppl 1: 21-26.
- [264] Bluestone JA, Mackay CR, O'Shea JJ, Stockinger B. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(11): 811-816.
- [265] Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol*, 2012. 32(6): 463-488.
- [266] Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, Nombela F, Vivancos J, Hamilton JA, Corbí AL, Lizasoain I, Moro MA. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR gamma agonist rosiglitazone. *Stroke*, 2013. 44(12): 3498-3508.
- [267] Inoue H, Fukuyama S, Matsumoto K, Kubo M, Yoshimura A. Role of endogenous inhibitors of cytokine signaling in allergic asthma. *Curr Med Chem*, 2007. 14(2): 181-189.
- [268] Yu CR, Kim SH, Mahdi RM, Egwuagu CE. SOCS3 deletion in T lymphocytes suppresses development of chronic ocular inflammation via upregulation of CTLA-4 and expansion of regulatory T cells. *J Immunol*, 2013. 191(10): 5036-5043.
- [269] Liu X, Qu X, Chen Y, Liao L, Cheng K, Shao C, Zenke M, Keating A, Zhao RC. Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation. *J Immunol*, 2012. 189(3): 1182-1192.
- [270] Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest*, 2001. 108(12): 1781-1788.

- [271] Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med*, 2001. 193(4): 471-481.
- [272] Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol Med Today*, 2000. 6(1): 20-27.
- [273] Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Williams TJ. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med*, 1994. 179(3): 881-887.
- [274] Ponath PD, Qin S, Post TW, Wang J, Wu L, Gerard NP, Newman W, Gerard C, Mackay CR. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J Exp Med*, 1996. 183(6): 2437-2448.
- [275] Daugherty BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkowitz L, Sirotna A, Springer MS. et al., Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med*, 1996. 183(5): 2349-2354.
- [276] Pope SM, Zimmermann N, Stringer KF, Karow ML, Rothenberg ME. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol*, 2005. 175(8): 5341-5350.
- [277] Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*, 1995. 86(5): 1649-1660.
- [278] Zimmermann N, Conkright JJ, Rothenberg ME. CC chemokine receptor-3 undergoes prolonged ligand-induced internalization. *J Biol Chem*, 1999. 274(18): 12611-12618.
- [279] Tenscher K, Metzner B, Schöpf E, Norgauer J, Czech W. Recombinant human eotaxin induces oxygen radical production, Ca(2+)-mobilization, actin reorganization, and CD11b upregulation in human eosinophils via a pertussis toxin-sensitive heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein. *Blood*, 1996. 88(8): 3195-3199.
- [280] Horie S, Okubo Y, Hossain M, Sato E, Nomura H, Koyama S, Suzuki J, Isobe M, Sekiguchi M. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Intern Med*, 1997. 36(3): 179-185.
- [281] Sturm EM, Schratl P, Schuligoi R, Konya V, Sturm GJ, Lippe IT, Peskar BA, Heinemann A. Prostaglandin E2 inhibits eosinophil trafficking through E-prostanoid 2 receptors. *J Immunol*, 2008. 181(10): 7273-7283.
- [282] Tager AM, Dufour JH, Goodarzi K, Bercury SD, von Andrian UH, Luster AD. BLTR mediates leukotriene B(4)-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. *J Exp Med*, 2000. 192(3): 439-446.
- [283] Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med*, 2001. 193(2): 255-261.

- [284] Shahabuddin S, Ponath P, Schleimer RP. Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines. *J Immunol*, 2000. 164(7): 3847-3854.
- [285] Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*, 1999. 285(5430): 1028-1032.
- [286] Giancotti FG, Tarone G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003. 19: 173-206.
- [287] Pretolani M, Ruffié C, Lapa e Silva JR, Joseph D, Lobb RR, Vargaftig BB. Antibody to very late activation antigen 4 prevents antigen-induced bronchial hyperreactivity and cellular infiltration in the guinea pig airways. *J Exp Med*, 1994. 180(3): 795-805.
- [288] Nakajima H, Sano H, Nishimura T, Yoshida S, Iwamoto I. Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *J Exp Med*, 1994. 179(4): 1145-1154.
- [289] Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, finger E, Martínez-A C, Siegelman MH, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos JC. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest*, 1996. 98(10): 2332-2345.
- [290] Jia GQ, Gonzalo JA, Hidalgo A, Wagner D, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos JC. Selective eosinophil transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. *Int Immunol*, 1999. 11(1): 1-10.
- [291] Gascoigne MH, Holland K, Page CP, Shock A, Robinson M, Foulkes R, Gozzard N. The effect of anti-integrin monoclonal antibodies on antigen-induced pulmonary inflammation in allergic rabbits. *Pulm Pharmacol Ther*, 2003. 16(5): 279-285.
- [292] Lantero S, Spallarossa D, Silvestri M, Sabatini F, Scarso L, Crimi E, Rossi GA. In allergic asthma experimental exposure to allergens is associated with depletion of blood eosinophils overexpressing LFA-1. *Allergy*, 2002. 57(11): 1036-1043.
- [293] Fukuishi N, Matsuhisa M, Shimono T, Murata N, Iwanaga M, Sagara H, Matsui N, Akagi M. Inhibitory effect of olopatadine on antigen-induced eosinophil infiltration and the LFA-1 and Mac-1 expression in eosinophils. *Jpn J Pharmacol*, 2002. 88(4): 463-466.
- [294] Park SH, Kim KE, Hwang HY, Kim TY. Regulatory effect of SOCS on NF-kappaB activity in murine monocytes/macrophages. *DNA Cell Biol*, 2003. 22(2): 131-139.
- [295] Oh J, Kim SH, Ahn S, Lee CE. Suppressors of cytokine signaling promote Fas-induced apoptosis through downregulation of NF-kappaB and mitochondrial Bfl-1 in leukemic T cells. *J Immunol*, 2012. 189(12): 5561-5571.
- [296] Wong CK, Wang CB, Li ML, Ip WK, Tian YP, Lam CW. Induction of adhesion molecules upon the interaction between eosinophils and bronchial epithelial cells: involvement of p38 MAPK and NF-kappaB. *Int Immunopharmacol*, 2006. 6(12): 1859-1871.
- [297] Dvorak AM, Estrella P, Ishizaka T. Vesicular transport of peroxidase in human eosinophilic myelocytes. *Clin Exp Allergy*, 1994. 24(1): 10-18.

- [298] Lopez E, Zafra MP, Sastre B, Gámez C, Lahoz C, del Pozo V. Gene expression profiling in lungs of chronic asthmatic mice treated with galectin-3: downregulation of inflammatory and regulatory genes. *Mediators Inflamm*, 2011. 2011: 823279.
- [299] Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets*, 2008. 9(6): 485-494.
- [300] Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech*, 2008. 1(4-5): 213-220.
- [301] Kumar RK, Foster PS. Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. 27(3): 267-272.
- [302] Shinagawa K, Kojima M. Mouse model of airway remodeling: strain differences. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. 168(8): 959-967.
- [303] Yasue M, Yokota T, Suko M, Okudaira H, Okumura Y. Comparison of sensitization to crude and purified house dust mite allergens in inbred mice. *Lab Anim Sci*, 1998. 48(4): 346-352.
- [304] Fulkerson PC, Rothenberg ME, Hogan SP. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. *Clin Exp Allergy*, 2005. 35(10): 1251-1253.
- [305] Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, Brenneise IE, Horton MA, Haczku A, Gelfand EW, Leikauf GD, Lee NA. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med*, 1997. 185(12): 2143-2156.
- [306] Rankin JA, Picarella DE, Geba GP, Temann UA, Prasad B, DiCosmo B, Tarallo A, Stripp B, Whitsett J, Flavell RA. Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(15): 7821-7825.
- [307] Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest*, 1999. 103(6): 779-788.
- [308] Temann UA, Ray P, Flavell RA. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest*, 2002. 109(1): 29-39.
- [309] Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*, 2002. 295(5553): 336-338.
- [310] Miyamoto S, Hattori N, Senoo T, Onari Y, Iwamoto H, Kanehara M, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Yokoyama A, Kohno N. Intra-airway administration of small interfering RNA targeting plasminogen activator inhibitor-1 attenuates allergic asthma in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011. 301(6): L908-916.
- [311] Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002. 297(5589): 2056-2060.
- [312] Bartlett DW, Davis ME. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(1): 322-333.

- [313] Scaringe SA. Advanced 5'-silyl-2'-orthoester approach to RNA oligonucleotide synthesis. *Methods Enzymol*, 2000. 317: 3-18.
- [314] Zhang X, Shan P, Jiang D, Noble PW, Abraham NG, Kappas A, Lee PJ. Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. *J Biol Chem*, 2004. 279(11): 10677-10684.
- [315] Kaplan J, Kaplan FS, Shore EM. Restoration of normal BMP signaling levels and osteogenic differentiation in FOP mesenchymal progenitor cells by mutant allele-specific targeting. *Gene Ther*, 2012. 19(7): 786-790.
- [316] Sachithanandan N, Fam BC, fynch S, Dzamko N, Watt MJ, Wormald S, Honeyman J, Galic S, Proietto J, Andrikopoulos S, Hevener AL, Kay TW, Steinberg GR. Liver-specific suppressor of cytokine signaling-3 deletion in mice enhances hepatic insulin sensitivity and lipogenesis resulting in fatty liver and obesity. *Hepatology*, 2010. 52(5): 1632-1642.
- [317] Elliott J. SOCS3 in liver regeneration and hepatocarcinoma. *Mol Interv*, 2008. 8(1): 19-21, 2.
- [318] Yasukawa H, Nagata T, Oba T, Imaizumi T. SOCS3: A novel therapeutic target for cardioprotection. *JAKSTAT*, 2012. 1(4): 234-240.
- [319] Sun F, Park KK, Belin S, Wang D, Lu T, Chen G, Zhang K, Yeung C, Feng G, Yankner BA, He Z. Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature*, 2011. 480(7377): 372-375.
- [320] Eum SY, Maghni K, Tolloczko B, Eidelman DH, Martin JG. IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. 288(3): L576-584.
- [321] Yang G, Volk A, Petley T, Emmell E, Giles-Komar J, Shang X, Li J, Das Am, Shealy D, Griswold DE, Li L. Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling. *Cytokine*, 2004. 28(6): 224-232.
- [322] Bochner BS, Gleich GJ. What targeting eosinophils has taught us about their role in diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 126(1): 16-25; quiz 26-7.
- [323] Foster PS, Rosenberg HF, Asquith KL, Kumar RK. Targeting eosinophils in asthma. *Curr Mol Med*, 2008. 8(6): 585-590.
- [324] Cimerman N, Mesko Brguljan P, Krasovec M, Suskovic S, Kos J. Serum concentration and circadian profiles of cathepsins B, H and L, and their inhibitors, stefins A and B, in asthma. *Clin Chim Acta*, 2001. 310(2): 113-122.
- [325] Fulkerson PC, Fischetti CA, Rothenberg ME. Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling. *Am J Pathol*, 2006. 169(6): 2117-2126.
- [326] Korideck H, Peterson JD. Noninvasive quantitative tomography of the therapeutic response to dexamethasone in ovalbumin-induced murine asthma. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. 329(3): 882-889.
- [327] Menzies-Gow A, Flood-Page P, Sehmi R, Burman J, Hamid Q, Robinson DS, Kay AB, Denburg J. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy induces bone marrow eosinophil maturational arrest and decreases eosinophil progenitors in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 111(4): 714-719.

- [328] Flood-Page P, Swenson C, Faferman I, Matthews J, Williams M, Brannick L, Robinson D, Wenzel S, Busse W, Hansel TT, Barnes NC; International Mepolizumab Study Group. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. 176(11): 1062-1071.
- [329] Liu Y, Zhang S, Li DW, Jiang SJ. Efficacy of anti-interleukin-5 therapy with mepolizumab in patients with asthma: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *PLoS One*, 2013. 8(3): e59872.
- [330] Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. 167(2): 199-204.
- [331] Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, Boulet LP, Lemièrre C, Pizzichini E, Cartier A, Hussack P, Goldsmith CH, Laviolette M, Parameswaran K, Hargreave FE. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J*, 2006. 27(3): 483-494.
- [332] Pavord ID, Korn S, Howarth P, Bleecker ER, Buhl R, Keene ON, Ortega H, Chanez P. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2012. 380(9842): 651-659.
- [333] Castro M, Mathur S, Hargreave F, Boulet LP, Xie F, Young J, Wilkins HJ, Henkel T, Nair P. Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: a randomized, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. 184(10): 1125-1132.
- [334] Molino NA, Gossage D, Kolbeck R, Parker JM, Geba GP. Molecular and clinical rationale for therapeutic targeting of interleukin-5 and its receptor. *Clin Exp Allergy*, 2012. 42(5): 712-737.
- [335] Manuyakorn W, Howarth PH, Holgate ST. Airway remodelling in asthma and novel therapy. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2013. 31(1): 3-10.
- [336] Kasaian MT, Marquette K, Fish S, DeClercq C, Agostinelli R, Cook TA, Brennan A, Lee J, Fitz L, Brooks J, Vuqmeyster Y, Williams CM, Lofquist A, Tchistiakova L. An IL-4/IL-13 dual antagonist reduces lung inflammation, airway hyperresponsiveness, and IgE production in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013. 49(1): 37-46.
- [337] Chiba Y, Todoroki M, Misawa M. Interleukin-4 upregulates RhoA protein via an activation of STAT6 in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacol Res*, 2010. 61(2): 188-192.
- [338] Chiba Y, Nakazawa S, Todoroki M, Shinozaki K, Sakai H, Misawa M. Interleukin-13 augments bronchial smooth muscle contractility with an up-regulation of RhoA protein. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. 40(2): 159-167.
- [339] Chiba Y, Matsusue K, Misawa M. RhoA, a possible target for treatment of airway hyperresponsiveness in bronchial asthma. *J Pharmacol Sci*, 2010. 114(3): 239-247.
- [340] Zhu M, Liu PY, Kashara DI, Williams AS, Verbout NG, Halayko AJ, Fedulov A, Shoji T, Williams ES, Noma K, Shore SA, Liao JK. Role of Rho kinase isoforms in murine allergic airway responses. *Eur Respir J*, 2011. 38(4): 841-850.
- [341] LoGrasso PV, Feng Y. Rho kinase (ROCK) inhibitors and their application to inflammatory disorders. *Curr Top Med Chem*, 2009. 9(8): 704-723.

- [342] Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Pagé N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. 108(3): 430-438.
- [343] Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I, Nakajima H. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. 178(10): 1023-1032.
- [344] Hausding M, Tepe M, Ubel C, Lehr HA, Röhrig B, Höhn Y, Pautz A, Eigenbrod T, Anke T, Kleinert H, Erkel G, Finotto S. Induction of tolerogenic lung CD4⁺ T cells by local treatment with a pSTAT-3 and pSTAT-5 inhibitor ameliorated experimental allergic asthma. *Int Immunol*, 2011. 23(1): 1-15.
- [345] Lan F, Zhang N, Zhang J, Krysko O, Zhang Q, Xian J, Derycke L, Qi Y, Li K, Liu S, Lin P, Bachert C. Forkhead box protein 3 in human nasal polyp regulatory T cells is regulated by the protein suppressor of cytokine signaling 3. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. 132(6): 1314-1321.
- [346] Barnes PJ. Targeting the epigenome in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2009. 6(8): 693-696.
- [347] Shaheen SO, Adcock IM. The developmental origins of asthma: does epigenetics hold the key?. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 180(8): 690-691.
- [348] Kwon NH, Kim JS, Lee JY, Oh MJ, Choi DC. DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma. *J Clin Immunol*, 2008. 28(2): 139-146.
- [349] Rebane A, Akdis CA. MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. 132(1): 15-26.
- [350] Plank M, Maltby S, Mattes J, Foster PS. Targeting translational control as a novel way to treat inflammatory disease: The emerging role of MicroRNAs. *Clin Exp Allergy*, 2013. 43 (9): 981-999.
- [351] Finnegan EJ, Matzke MA. The small RNA world. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 23): 4689-4693.
- [352] Garbacki N, Di Valentin E, Huynh-Thu VA, Geurts P, Irrthum A, Crahay C, Arnould T, Deroanne C, Piette J, Cataldo D, Colige A. MicroRNAs profiling in murine models of acute and chronic asthma: a relationship with mRNAs targets. *PLoS One*, 2011. 6(1): e16509.
- [353] Caramori G, Lim S, Ito K, Tomita K, Oates T, Jazrawi E, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. *Eur Respir J*, 2001. 18(3): 466-473.
- [354] Collison A, Herbert C, Siegle JS, Mattes J, Foster PS, Kumar RK. Altered expression of microRNA in the airway wall in chronic asthma: miR-126 as a potential therapeutic target. *BMC Pulm Med*, 2011. 11: 29.

ANEXO: PUBLICACIONES

La presente tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones, que se anexan a continuación en el siguiente orden:

1. López E, **Zafra MP**, Sastre B, Gámez C, Lahoz C, del Pozo V. "Gene expression profiling in lungs of chronic asthmatic mice treated with galectin-3: downregulation of inflammatory and regulatory genes". *Mediators of Inflammation*, 823279, Epub Marzo 2011, 20.
2. López E, **Zafra MP**, Sastre B, Gámez C, Fernández-Nieto M, Sastre J, Lahoz C, Quirce S, Del Pozo V. "Suppressors of cytokine signaling 3 expression in eosinophils: regulation by PGE₂ and Th2 cytokines". *Clinical and Developmental Immunology*, 917015, Epub Abril 2011, 27.
3. **Zafra MP**, Cancelliere N, Estevez L, Rodríguez Del Rio P, Ruiz-Garcia M, Andregnette V, Sanchez-Garcia S, Fiandor A, Collantes E, Sastre J, Quirce S, Ibañez MD, Del Pozo V. "Misregulation of suppressors of cytokine signaling in eosinophilic esophagitis". *J Gastroenterol*. 48 (8):910-20, 2013.
4. **Zafra MP**, Mazzeo C, Gámez C, Rodríguez-Marco A, de Zulueta A, Sanz V, Bilbao I, Ruiz-Cabello J, Zubeldia JM, del Pozo V. "Gene silencing of SOCS3 by siRNA intranasal delivery inhibits asthma phenotype in mice". *PLoS One*. 9(3):e91996, 2014.

Research Article

Gene Expression Profiling in Lungs of Chronic Asthmatic Mice Treated with Galectin-3: Downregulation of Inflammatory and Regulatory Genes

Esther López, M. Paz Zafra, Beatriz Sastre, Cristina Gámez, Carlos Lahoz, and Victoria del Pozo

Immunology Department IIS-Fundación Jiménez Díaz, CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), 28040 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Victoria del Pozo, vpozo@fjd.es

Received 5 October 2010; Accepted 23 January 2011

Academic Editor: A. Malamitsi-Puchner

Copyright © 2011 Esther López et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Asthma is a disorder characterized by a predominance of Th2 cells and eosinophilic inflammation. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins act as negative regulators of cytokine signaling. In particular, SOCS1 and SOCS3 play an important role in immune response by controlling the balance between Th1 and Th2 cells. In a previous study, we demonstrated that treatment of chronic asthmatic mice with gene therapy using plasmid encoding galectin-3 (Gal-3) led to an improvement in Th2 allergic inflammation. **Methods.** Using a microarray approach, this study endeavored to evaluate the changes produced by therapeutic Gal-3 delivered by gene therapy in a well-characterized mouse model of chronic airway inflammation. Results were confirmed by real-time RT-PCR, Western blot and immunohistochemical analysis. **Results.** We identify a set of genes involved in different pathways whose expression is coordinately decreased/increased in mice treated with Gal-3 gene therapy. We report a correlation between Gal-3 treatment and inhibition of SOCS1 and SOCS3 expression in lungs. **Conclusion.** These results suggest that negative regulation of SOCS1 and 3 following Gal-3 treatment could be a valuable therapeutic approach in allergic disease.

1. Introduction

Asthma is a complex chronic disease characterized by airway inflammation, airway hyperresponsiveness (AHR), and reversible airway obstruction. In addition, structural changes causing remodeling occur as a result of an imbalance in the mechanisms behind lung tissue regeneration and repair [1, 2].

Cytokines play an essential role in immune system regulation [3]. In both physiologic and pathologic conditions, cytokine functions are strictly controlled. Cytokine signaling pathways are negatively regulated by the so-called suppressor of cytokine signaling (SOCS) family of proteins. SOCS proteins not only act as simple negative-feedback regulators, but are also involved in fine-tuning the immune response and in the cross-talk of the complicated cytokine signal networks [4]. Since cytokines are constantly present in the microenvironment of immune cells, signal regulation by

SOCS-family proteins must be important for the proper progress, remission, and relapse of an immune response. SOCS1, SOCS3, and SOCS5 therefore participate in CD4+ Th-cell differentiation and in Th1/Th2-cell balance [5]. Of these, SOCS3 has been shown to inhibit IL-2 production during T-cell activation, is predominantly expressed in Th2 cells, and inhibits Th1 differentiation [6–8]. Conversely, SOCS5 is predominantly expressed in Th1 cells and inhibits Th2 differentiation [9]. The data with respect to SOCS1 are controversial; indeed, Fujimoto et al. showed that SOCS1 negatively regulates both Th1 and Th2 cell differentiation in response to IL-12 and IL-4, respectively [10]. In contrast, SOCS1 is a strong negative-feedback regulator of IFN γ , and thus positively regulates Th17-cell differentiation by suppressing the antagonistic effect of IFN γ [4].

Gal-3 is an immunoglobulin IgE-binding protein which belongs to a family of proteins that bind β -galactosides. It has a unique amino-terminal domain, a highly conserved

repetitive sequence rich in proline and glycine, and a globular carboxyl-terminal domain containing the carbohydrate recognition site. Gal-3 is expressed in a variety of tissues and cell types [11]. In addition, it has been implicated in different processes, including inflammation and allergic pathologies [12, 13]. We previously reported that administration of Gal-3 by means of gene therapy inhibits asthmatic reactions by downregulating IL-5 gene expression [14–16]. However, in a complex pathology such as asthma, there are many factors and pathways implicated, which is why we planned to study more genes.

Genome-wide expression analysis with microarrays has become a mainstay of genomics research [17, 18]. The challenge no longer lies in obtaining gene expression profiles, but rather in interpreting the results to gain insights into biological and molecular disease mechanism or identify gene expression changes characteristic of different diseases, or to study the gene expression profiles, whose are affected by specific treatment. To overcome these analytical challenges, several authors propose evaluating microarray data at the gene-set level-based on prior biological knowledge [19].

In this study, we used cDNA microarrays to gain a detailed molecular picture of the programmed responses of the asthmatic mice to Gal-3 gene therapy. The transcriptional program was analyzed in lung samples from asthmatic mice treated with Gal-3 and asthmatic mice that did not receive the treatment. A set of pathways and genes was identified by microarrays and then selected for further analysis by RT-PCR, immunohistochemistry staining, and Western blot to confirm and explore their corresponding protein level. Analysis of the transcriptional program reveals striking evidence of global differences between mice treated with Gal-3 and those that are not. The most prominent feature of the gene signature identified in treated mice was a pattern of reduced inflammatory genes and regulatory genes. SOCS1 and 3 were also among the inflammatory genes found to be more abundant in asthmatic mice as compared to Gal-3-treated mice. Accordingly, one of the new models of therapy for allergic diseases could entail targeting SOCS3 by using a Gal-3 gene therapy approach via inhibition of Th2 response. Such an immunomodulatory approach may have the beneficial effect of balancing the immune system.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Development of Chronic Asthma by Intranasal Administration of OVA and Gal-3 Gene Treatment. All experimental procedures conformed to international standards of animal welfare and were approved by the Fundación Jiménez Díaz Animal Research Ethics Committee. Male A/J mice (specific pathogen-free: 5 weeks old) were purchased from Harlan Iberica.

Experimental protocols were performed as previously reported [16]. The mice were placed in a small box and anesthetized with inhaled Forane (Abbott, IL). The anesthetized mice inhaled 1 mg/mL OVA (grade V; Sigma, St. Louis, MO) intranasally. OVA was administered 3 days per week for twelve weeks using a previously described method [16].

Fourteen days after the first OVA inhalation and once every 15 days thereafter, the mice received intranasal inhalations of 50 μ L of plasmid (1 mg/mL) encoding Gal-3 (pEGFP-Gal-3, $n = 20$) or with plasmid without insert (pEGFP, $n = 15$) or with saline (OVA, $n = 15$) as positive controls. An additional negative control group was used in which mice were injected with saline and exposed to saline inhalation (SS, $n = 10$).

After instillation of plasmid into the lungs, Gal-3 was detected by immunohistochemistry as previously reported [16].

2.2. RNA Extraction and Microarray Hybridization. Twenty-four hours after the last administration of antigen, the mice were anesthetized and the lungs were removed. Total RNA was isolated from the lungs using TRIzol Reagent (Life Technologies, Paisley, UK) according to the manufacturer's protocol. Purity and integrity of the RNA was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), and degraded samples were discarded. Concentration was determined using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer. A total of 5 μ g of purified RNA samples was submitted to the Gene Expression Department of Complutense University (Madrid, Spain) for labeling and hybridization. In total, 19 samples were analyzed: six from the OVA group, 8 from the pEGFP-Gal-3 group, and five from the SS group. Following all appropriate protocols and procedures for quality control, labeling, and fragmentation of eukaryotic total RNA, the biotin-labeled cRNA samples were hybridized to Mouse Genome 430 2.0 Microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) according to manufacturer protocols.

2.3. Microarray Data Analysis

2.3.1. Bioinformatics Analysis. Microarray analysis was performed by the Bioinformatics Department of the Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, Spain) using GEPAS version 3.1 (<http://www.gepas.org/>) [20]. Functional analysis was carried out using the Babelomics suite (<http://www.babelomics.org/>).

2.3.2. Preprocessing. Output data from the microarray normalization process were preprocessed before microarray analysis. Data were standardized using RMA [21]. Multiple probes mapping to the same gene were merged using the average as the summary of the hybridization values.

2.3.3. Differential Gene Expression. Differential gene expression was carried out using the *Limma* package from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) [22]. To account for multiple testing effects, *P*-values were corrected using the false discovery rate [23].

2.3.4. Functional Analysis. FatiScan, a variant of the gene set enrichment algorithm that detects significant up- or downregulated blocks of functionally related genes from a list of genes ordered by differential expression [24], was used to

detect activations or deactivations in biological functions or pathways. FatiScan is part of the Babelomics suite. FatiScan can search blocks of genes that are functionally related by different criteria such as gene ontology terms or KEGG pathways.

2.4. Real-Time RT-PCR. Quantitative real-time PCR was performed for selected genes (SOCS-1, -3, -5, IL-10, and TGF- β 1) on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK). TaqMan PCR was performed using a 20 μ L final reaction volume containing 10 μ L of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA), 1 μ L of 20X Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix, and 9 μ L of cDNA diluted in RNase-free water. Each assay was performed in triplicate. The PCR conditions used in all reactions were 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, with 40 two-step cycles (95°C for 15 s and 60°C for 60 s). Assays-on-Demand Gene Expression primers specific for SOCS1, SOCS3, SOCS5, IL-10 and TGF- β 1 and rRNA (used as an endogen) were obtained from Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com/>). The genes analyzed in this study were examined for their relative expression by means of the $\Delta\Delta C_T$ method [25].

2.4.1. Western Blot Analysis. Lung lysates were prepared in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 mM Na₄P₂O₇, 40 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 2 mM Na₃VO₄, and 1 mM PMSF with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The lysates (10–20 μ g total protein) were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. The blots were incubated for 60 min with a 1 : 400 dilution of primary rabbit anti-SOCS3 (Cell Signalling, Technology) or anti- β -actin antibody. The secondary antibody, HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG, was diluted 1 : 10000. Chemiluminescent protein bands were detected by an ECL detection system (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocol.

2.5. Immunohistochemistry. The lungs were instilled with neutral buffered Formalin in PBS, pH 7.2, the trachea was tied off, and the lungs were immersed in Formalin overnight. After fixation, the lung tissues were embedded in paraffin and cut into 6- μ m-thick sections. Tissue sections (6 μ m) were deparaffinized with xylene and dehydrated with a series of graded alcohol solutions to automation buffer (AB) consisting of 5% NaCl and 2% HCl (Biomedex, Foster City, CA). Endogenous peroxidase was blocked in methanol and 3% (vol/vol) H₂O₂ for 15 min. After the sections were washed twice, blocking was performed with BSA 4% and normal goat serum 6% in PBS % 20 min at 25°C. The slides were incubated with a primary rabbit anti-SOCS3 antibody (Cell Signalling, Tech) at 60 μ g/mL for 30 min at room temperature. For detection of SOCS3, a rabbit Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used as follows: sections were washed twice with AB and then incubated for 30 min with a 1 : 400 dilution of biotinylated secondary goat antirabbit IgG. Slides were washed again and incubated

with the Elite avidin-biotin complex (Vector Laboratories) for 30 min. For staining, slides were washed 5 times with AB, and then the antibody complex was visualized using a diaminobenzidine tablet (10 mg; Sigma Chemical, St. Louis, MO) dissolved in 20 mL of AB containing 12 μ L of 30% H₂O₂ for 6 min in the dark. All slides were then rinsed in running tap water, counterstained with hematoxylin (Harelico, Gibbstown, NJ), dehydrated through a series of graded alcohols to xylene, and covered with a coverslip with Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ).

2.6. Statistical Analysis. The data from real-time RT-PCR were expressed as geometric mean and standard deviation (SD) values for a group size of 10–20 from three different experiments. Results were compared and evaluated using the Kruskal-Wallis test and Dunn's posttest multiple comparison test. Statistical significance was recognized at $P \leq .05$. Statistical analyses were performed using GraphPad InStat3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Differential Gene Expression. We used microarrays to profile expression of over 37,169 genes in lung tissues from six mice with asthma (OVA group), 8 mice treated with plasmid encoding Gal-3 gene (pEGFP-Gal-3 group), and five from the negative control group (SS group). Differential gene expression in each group was compared with that observed in other groups. OVA mice exhibited higher mRNA expression of TGF- β , SOCS-1, SOCS-3, IL17A, and IL17F than that seen in the pEGFP-GAL-3 mice. When comparing the pEGFP-Gal-3 and the SS groups, only 2 genes were uprepresented while for the OVA and the SS groups, 977 were uprepresented and 788 downrepresented (adjusted P -value < .05).

3.2. Gene Ontology. The FasScan test for gene set enrichment analysis was applied to analyze the transcriptional profiles of mice treated with pEGFP-Gal-3 versus the untreated OVA group. We observed a significant upregulation of several biological processes and a downregulation of another (adjusted P -value < .05, Figure 1) at level 4 of gene ontology.

Additional analysis of gene biological function revealed gene enrichment in several pathways. Interestingly, some of these pathways presented an overexpression of core genes in OVA mice and underexpression in Gal-3-treated mice (SOCS, TGF- β , and IL-10). Table 1 shows the differentially expressed genes within these functional categories.

3.3. Downregulation of SOCS1 and SOCS3 Gene Expression by Gal-3 Treatment. Considering the results obtained by microarray, we set out to discover whether Gal-3 treatment affected SOCS expression. SOCS1, SOCS3, and SOCS5 gene expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in lung tissue from mice groups.

When mice were treated for 12 weeks with Ag and pEGFP-Gal-3, the relative level of SOCS1 and SOCS3 expression was significantly lower than it was in OVA-exposed mice without gene treatment: 1.103 versus 5.69 $P < .001$

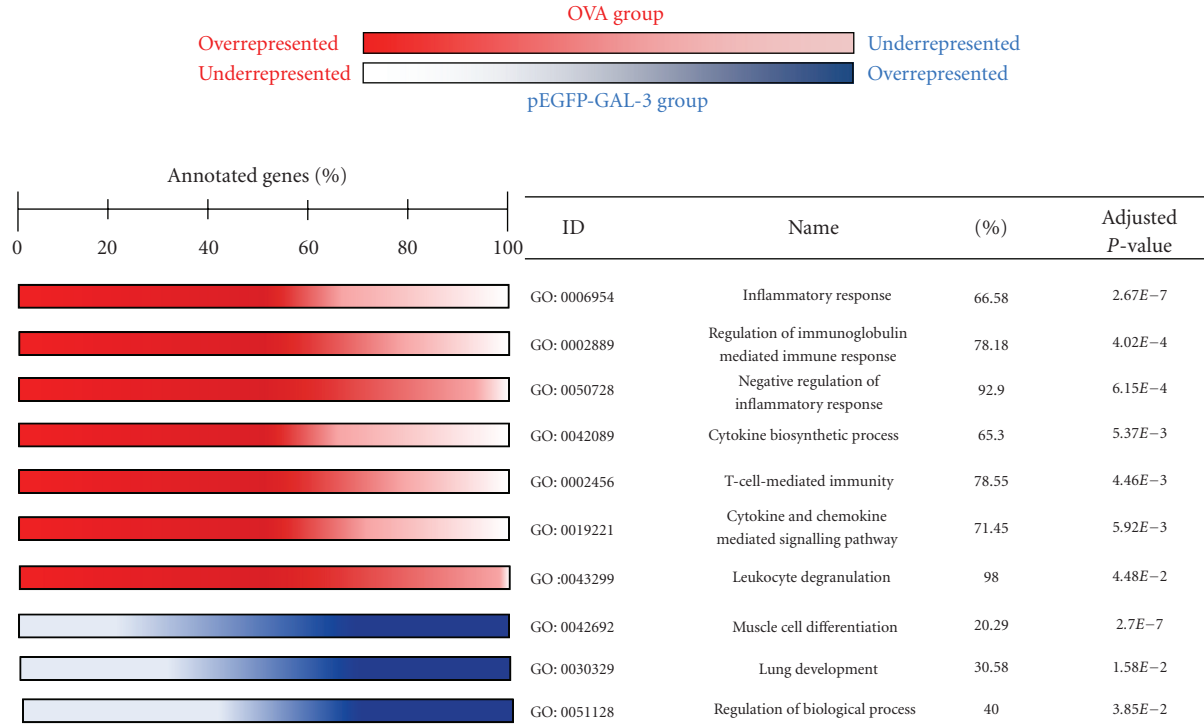


FIGURE 1: Biological pathway up- and downregulated in OVA versus pEGFP-GAL. Red indicates the biological processes overrepresented in the OVA group (percentage >50), and blue indicates that these pathways are overrepresented in the pEGFP-Gal-3 group (percentage <50).

TABLE 1: Genes included in upregulated gene ontology pathways in OVA versus pEGFP-GAL 3 comparison.

| Biological process (GO database) | Genes |
|---|---|
| Inflammatory response | <i>IDO1, IL17A, IL17B, IL17F, IL1A, IL25, TGFB1, IL6, IL4, FOXP3, JAK2, STAT5A, TLR4</i> |
| Regulation of immunoglobulin mediated immune response | <i>BCL6, FOXP3, FCG2B, IGH7, TNF, TGFB1, IL4, STAT6, IGH1A, IGH3, IGH7, C3, IL27RA</i> |
| Negative regulation of inflammatory response | <i>IL10, FOXP3, TGFB, SOCS3, IL2, TNF1B, AD, FOXF1A, IL2RA, ZFP36</i> |
| Cytokine biosynthetic process | <i>ADAM3, GATA3, IGF2BP1, IL12B, MAP2K3, IL6, FOXP3, IL-10, NFKB1, BCL3, INFG, IL1B, TNF, WNT5A, IL21, IL1A, STAT5, IL17F</i> |
| T-cell-mediated immunity | <i>IL4RA, BCL6, TGFB, IL20RB, IL2RA, IDO, FOXP3, CD27, CD74, LAG3, CASP3</i> |
| Cytokine and chemokine mediated signalling pathway | <i>ILR1, IL23R, IL2RB, IL3, IL5, JAK1, JAK3, SOCS1, SOCS3, SOCS5, STAT1, STAT3, STAT5A, STAT5B, IL6, IL6RA, TNF</i> |
| Leukocyte degranulation | <i>P4K2A, RAB27A, IGH7, HMOX1, FOXF1A, FCER1A, FCER1G, PRAM1</i> |

GO: Gene Ontology.

and 1.14 versus 3.47 $P < .01$, respectively, representing nearly 80.6% and 67.15% inhibition (Figures 2(a) and 2(b)). However, treatment with empty plasmid did not significantly modify SOCS expression in comparison with the OVA group. Moreover, statistically significant differences were observed upon comparing groups treated with empty plasmid and plasmid-encoding Gal-3 in SOCS1 and SOCS3 expression, respectively ($P < .01$).

There was no significant change in the levels of SOCS5 gene expression (Figure 2(c)).

3.4. Forced Gal-3 Expression by Gene Therapy Inhibits SOCS3 Protein Expression. To ascertain whether the same effect was observable in protein expression, we performed a Western blot analysis in lung tissue using an anti-SOCS3 antibody. As depicted in Figure 3(a), higher SOCS3 protein expression was detected in the lungs of the OVA group of mice. The pEGFP-Gal-3 and SS groups showed low constitutive expression of SOCS3. Figure 3(b) shows SOCS3 protein expression quantified by densitometry and normalized by β -actin. The results indicate that SOCS3 was more

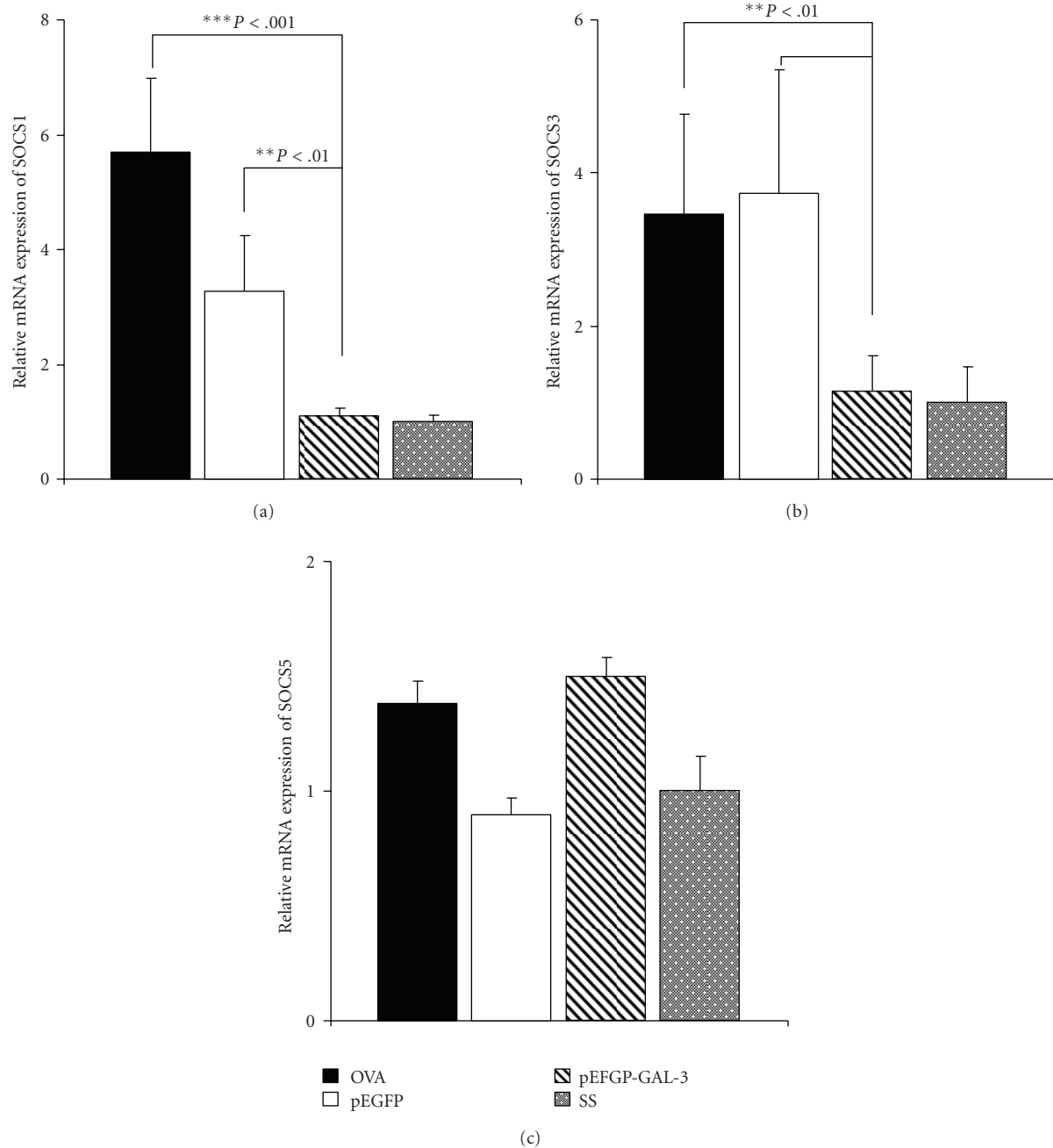


FIGURE 2: Semiquantitative expression of SOCS1, SOCS3, and SOCS5 genes in lungs after twelve weeks of OVA exposure. Relative mRNA levels of SOCS1 (a), SOCS3 (b), and SOCS5 (c) gene expression in lungs of different groups of mice were determined by real-time quantitative PCR. Values were normalized with rRNA gene used as endogen. Black bars represent the OVA group ($n = 15$), white bars the pEGFP group ($n = 15$), shaded bars the pEGFP-Gal-3 group ($n = 20$), and gray bars the SS group ($n = 10$). The results show relative gene expressions, as determined by the $\Delta\Delta C_T$ method, after twelve weeks of antigen exposure. Significant differences in SOCS3 and SOCS1 ($**P < .01$ and $***P < .001$) expression levels were obtained for the pEGFP-Gal-3 versus the OVA and pEGFP groups.

strongly expressed in the lungs of asthmatic mice than in the plasmid encoding Gal-3 gene and negative control mice.

3.5. Accumulation of SOCS3-Expressing Cells in the Lungs of Asthmatic Mice Is Inhibited by Gal-3. Accordingly, immunohistochemical analysis was then used to examine SOCS3

protein expression at the inflammatory site. In the OVA- and pEGFP-treated mice, SOCS3-expressing cells were present in high numbers at the inflammatory site (Figures 4(b) and 4(c)) and in airway epithelial cells. Whereas the Gal-3-treated mice displayed no SOCS3-expressing cells (Figure 4(d)), the appearance of the lungs was similar to that of the control mice (Figure 4(a)).

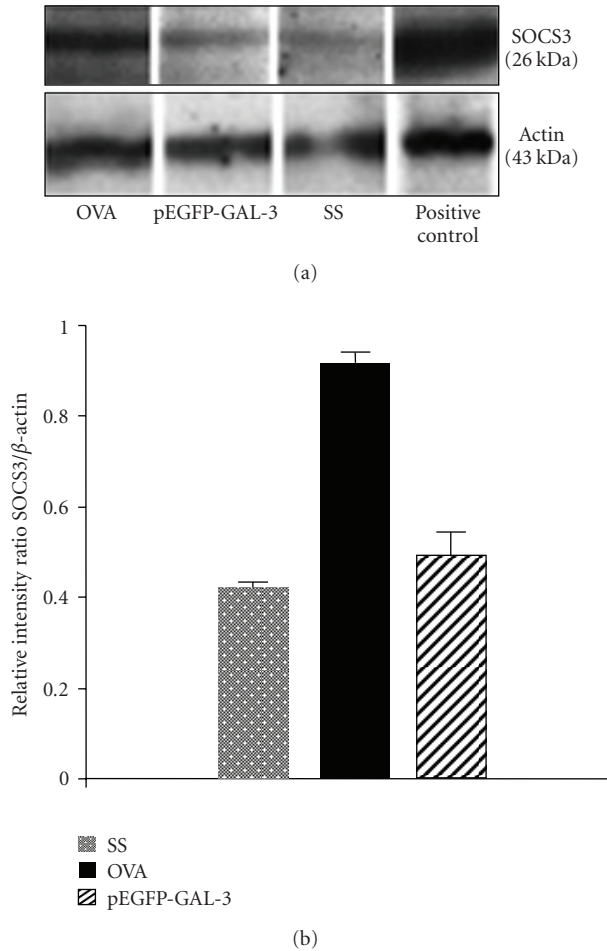


FIGURE 3: Western blot of SOCS3. (a) Protein extract from lungs was separated by 12% SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membranes. Detection of SOCS3 was performed with goat anti-mouse IgG. Actin was used as the internal control. (b) SOCS3 bands were quantified by densitometry and corrected by actin expression. Densitometric analysis reveals a strong expression of SOCS3 protein in the OVA group, compared with the pEGFP-Gal-3 and SS groups. Data are expressed as the geometric mean \pm SD, $n = 4$, $*P < .05$.

3.6. SOCS1 and SOCS3 Affect Production of Both IL-10 and TGF- β_1 after Gene Inhibition with Gal-3. Activated T cells migrate to the lungs and release inflammatory and regulatory cytokines to orchestrate the allergic response. Given the differential SOCS3 expression in groups of mice (Gal-3-treated versus OVA), we predicted that regulatory cytokines would be affected by the relatively low levels of SOCS1 and SOCS3 expression in Gal-3-treated mice. We, therefore, assessed the effect of Gal-3 gene therapy on regulatory cytokine levels (IL-10 and TGF- β_1) in lungs after 12 weeks of chronic OVA-challenge. When the mice were treated for twelve weeks with antigen and pEGFP-Gal-3, the relative level of IL-10 and TGF- β_1 expression was significantly lower than it was among OVA-exposed mice without gene treatment: 1.2 versus 4.4 and 1.4 versus

10.5 $P < .001$, representing nearly 72.72% and 86.60% inhibition, respectively (Figure 5). However, treatment with empty plasmid did not significantly modify IL-10 and TGF- β_1 expression compared to the OVA group.

4. Discussion

The present study used microarray technology to define the patterns of expression associated with Gal-3 gene therapy in lungs of asthmatic mice. In particular, we compared gene expression in lungs from OVA and pEGFP-Gal-3 groups. We identified a “Gal-3 treated signature” gene-expression profile that was induced in the OVA mouse lung by exposure to Gal-3. This signature profile included several genes related to lung development, inflammatory response, and so forth. One of the most important findings of this study is the failure to identify a sole induced gene despite the fact that several pathways were indeed induced or underregulated. This is not surprising because asthma is a complex disease with many factors.

Traditional strategies for gene expression analysis have focused on identifying individual genes that exhibit differences between two states of interest. Although useful, they fail to detect complex biological processes that are distributed across a network of genes and are subtle at the level of individual genes. Also, high variability between mice and limited sample sizes make it difficult to distinguish gene differences. Thus, an analytical strategy, Gene Set Enrichment Analysis, has been designed to detect coordinate changes in the expression of groups of functionally related genes [25].

The analysis of gene biological function revealed gene enrichment in several pathways when comparing the OVA and pEGFP-Gal-3 groups. Interestingly, inflammatory response, leukocyte activation, and cytokine production processes presented a significant overexpression in mice from the OVA group compared to mice treated with Gal-3 gene therapy. These data were consistent with our previous results [16]. One of the pathways that underwent significant enrichment in OVA mice in comparison to the pEGFP-GAL-3 mice group were the processes implicated in negative regulation of inflammatory response. Prominent among this class of intracellular regulators are members of the SOCS family of proteins [3, 26]. Significant interest in the SOCS family stems from the belief that SOCS proteins may integrate multiple cytokine signals and mediate cross-communication between antagonistic cytokines produced by different cells through their inhibitory effects on cytokine receptors and signaling molecules.

SOCS proteins exercise negative regulation for many aspects of cytokine signaling. Hence, some members of the SOCS protein family (SOCS1, 3 and 5) participate in the regulation of Th1/Th2 balance [27, 28].

We confirmed microarray data using real-time quantitative PCR, demonstrating that mice treated with Ag and pEGFP-Gal-3 showed significantly lower levels of SOCS1 and SOCS3 expression than OVA-exposed mice not receiving gene treatment. These data are in concordance

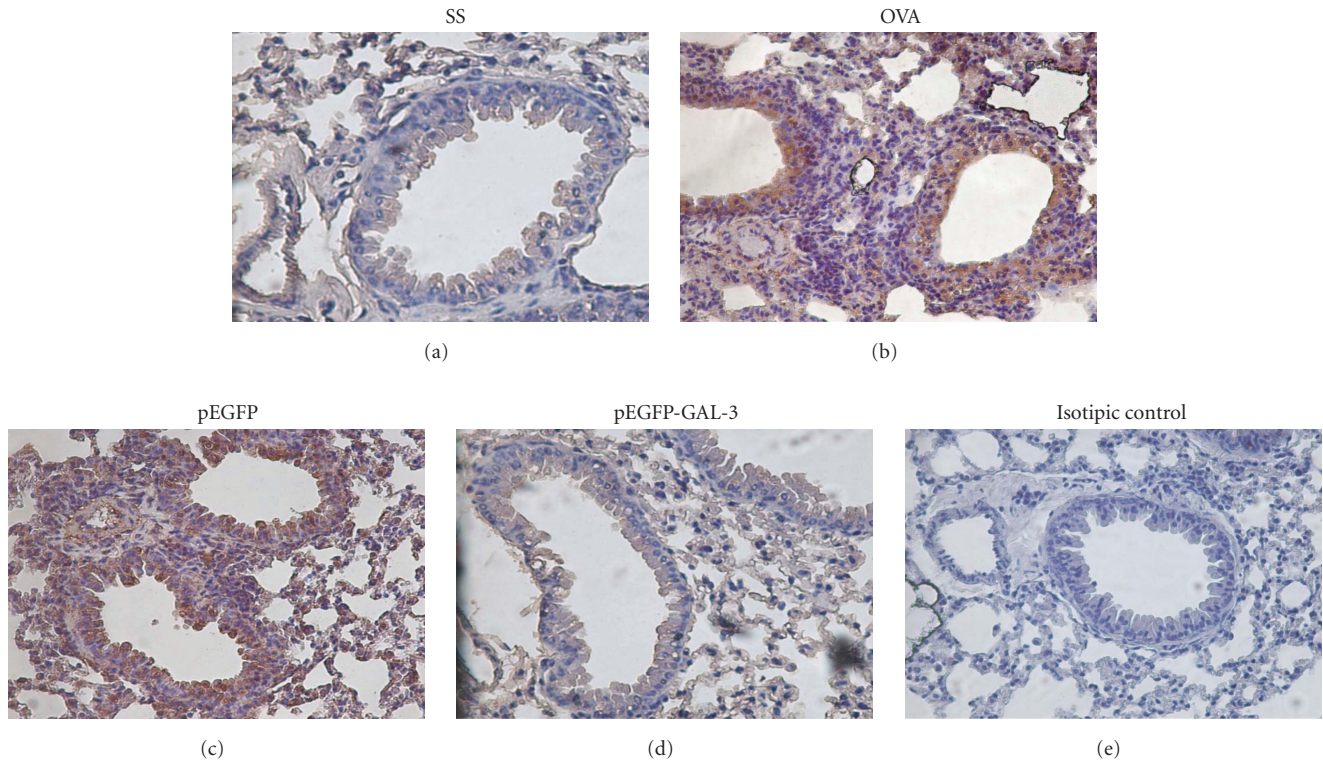


FIGURE 4: Immunohistochemical expression of SOCS-3 in lung tissue from A/J mice. (a) Saline control group (untreated). (b) Positive control group (OVA group) with chronic allergic airway inflammation. (c) pEGFP group, OVA immunized animals treated with empty plasmid. (d) pEGFP-Gal-3 group, OVA immunized animals treated with plasmid encoding Gal-3. (e) Control using normal goat IgG instead of goat anti-SOCS3 antibody. The picture is a representative example of 5 mice, all displaying similar results.

with other studies described in the literature in which no differences were found in SOCS5 gene-expression levels between healthy patients and those with asthma or atopic dermatitis. Nevertheless, SOCS3 expression levels are high in T cells from patients with this allergic disease [29].

In the group of mice receiving plasmid with Gal-3 gene by intranasal administration, we obtained values similar in SOCS3 and SOCS1 gene expression to those of the healthy group and lower than those of the other two groups of asthmatic mice that had not received pEGFP-Gal-3. This suggests that gal-3 may be exercising some direct or indirect effect on the transcription of the genes of SOCS3 and SOCS1.

The impact of gal-3 therapy on SOCS3 was further confirmed by Western blot and by immunohistochemical analysis. Accumulation of SOCS3-expressing cells at the inflammatory site coincides with accumulation of inflammatory cells. In the mice treated with Gal-3, however, there was a correlation between non-SOCS3-expressing cells and absence of inflammatory cells, probably due to the fact that SOCS3 is predominantly expressed in Th2 cells. These results suggest that migration of SOCS3-expressing cells may be implicated in the development and exacerbation of lung inflammation, therefore suggesting that downregulation of SOCS3 expression by Gal-3 inhibits development of lung

inflammation. In brief, the protein expression results were similar to those yielded by gene expression analysis.

Activated T cells migrate to the lungs and release inflammatory and regulatory cytokines to orchestrate the allergic response. We, therefore, assessed the effect of Gal-3 gene therapy on lung regulatory cytokine levels (IL-10 and TGF- β_1) after 12 weeks of chronic OVA-challenge. Our results indicated that IL-10 and TGF- β_1 may be intermediary cytokines involved in SOCS3 expression. Also appearing in Table 1 are *IL17A*, *IL17B*, *IL17F*, *TGFB1*, *FOXP3*, *IL10*, *SOCS3*, *SOCS1*, *SOCS5*, and *STAT3* as genes that are up-regulated in Gene Ontology pathways in OVA versus pEGFP-GAL 3 mice, all of which are implicated in regulatory immune response. In a finding similar to ours, McGee et al. observed that the therapeutic effect of FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3) in reversing the hallmarks of allergic asthma in a mouse model is mediated by decreasing TGF- β , which in turn decreases Th17 cells and the expression of SOCS1 and SOCS3 in the lung of asthmatic mice [30]. Also, there is increasing evidence showing that IL-10 induces SOCS3 gene expression through the activation of STAT3, which activates the SOCS3 promoter [31].

This study demonstrates that SOCS proteins are implicated in the mechanism whereby Th2 allergic asthma is inhibited by Gal-3. The role of Gal-3 in TH1/Th2 immune

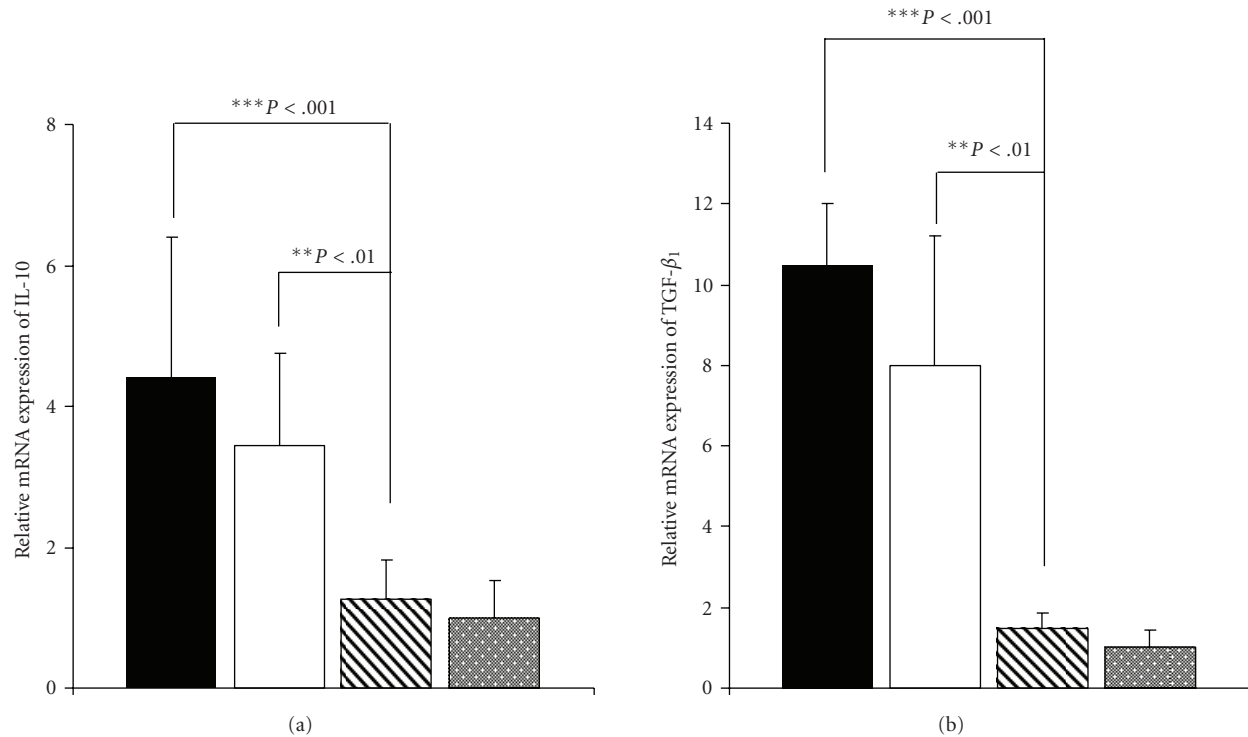


FIGURE 5: Effect of Plasmid with Gal-3 on Quantitative Expression of Cytokine Genes in lungs after Twelve Weeks of OVA Exposure. Relative mRNA levels of IL-10 (a) and TGF- β_1 (b) gene expression in lungs from different groups of mice were determined by real-time quantitative PCR. Values were normalized with the rRNA gene used as an endogen. Black bars represent the OVA group (geometric mean \pm SD, $n = 15$), white bars the pEGFP group (geometric mean \pm SD, $n = 15$), shaded bars the pEGFP-Gal-3 group (geometric mean \pm SD, $n = 20$), and gray bars the SS group (geometric mean \pm SD, $n = 10$). The results show relative gene expressions, as determined by the $\Delta\Delta C_T$ method, after twelve weeks of antigen exposure. Significant differences in IL-10 and TGF- β_1 ($***P < .001$) expression levels were obtained for the pEGFP-Gal-3 versus the OVA and pEGFP groups. In the case of empty plasmid, no significant differences were found with respect to the OVA group.

and inflammatory responses appears to vary according to the experimental models used (administration of Gal-3 versus Gal-3 null animals) [15, 16, 32]. We provide evidence of a correlation between treatment with Gal-3 and inhibition of SOCS1 and SOCS3 expression in lungs. These results suggest that negative regulation of SOCS1 and 3 by Gal-3 treatment could be a good therapeutic approach in allergic diseases.

Accordingly, one of the new models of therapy for allergic diseases could entail targeting SOCS3 by using a Gal-3 gene therapy approach via inhibition of Th2 response. Such an immunomodulatory approach may have the beneficial effect of controlling the appropriate balance of the immune system.

Acknowledgments

This study was supported by Fondo de Investigación Sanitaria—FIS (PI06/055 and PS09/00153), CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), a Carlos III Institute of Health initiative, and Conchita Rábago Foundation (C. Gámez and M. P. Zafra).

References

- [1] J. Bousquet, P. K. Jeffery, W. W. Busse, M. Johnson, and A. M. Vignola, "Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 161, no. 5, pp. 1720–1745, 2000.
- [2] P. K. Jeffery, A. J. Wardlaw, F. C. Nelson, J. V. Collins, and A. B. Kay, "Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 140, no. 6, pp. 1745–1753, 1989.
- [3] W. S. Alexander and D. J. Hilton, "The role of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response," *Annual Review of Immunology*, vol. 22, pp. 503–529, 2004.
- [4] A. Yoshimura, T. Naka, and M. Kubo, "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 6, pp. 454–465, 2007.
- [5] M. Fujimoto and T. Naka, "Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules," *Trends in Immunology*, vol. 24, no. 12, pp. 659–666, 2003.
- [6] C. R. Yu, R. M. Mahdi, S. Ebong, B. P. Vistica, I. Gery, and C. E. Egwuagu, "Suppressor of cytokine signaling 3 regulates

- proliferation and activation of T-helper cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 32, pp. 29752–29759, 2003.
- [7] A. Banerjee, A. S. Banks, M. C. Nawijn, X. P. Chen, and P. B. Rothman, "Cutting edge: suppressor of cytokine signaling 3 inhibits activation of NFATp," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 9, pp. 4277–4281, 2002.
 - [8] A. Matsumoto, Y. I. Seki, R. Watanabe et al., "A role of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3/CIS3/SSI3) in CD28-mediated interleukin 2 production," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 197, no. 4, pp. 425–436, 2003.
 - [9] M. Kubo, T. Hanada, and A. Yoshimura, "Suppressors of cytokine signaling and immunity," *Nature Immunology*, vol. 4, no. 12, pp. 1169–1176, 2003.
 - [10] M. Fujimoto, H. Tsutsui, S. Yumikura-Futatsugi et al., "A regulatory role for suppressor of cytokine signaling-1 in T polarization in vivo," *International Immunology*, vol. 14, no. 11, pp. 1343–1350, 2002.
 - [11] C. A. Gritzmacher, M. W. Robertson, and F. T. Liu, "IgE-binding protein. Subcellular location and gene expression in many murine tissues and cells," *Journal of Immunology*, vol. 141, no. 8, pp. 2802–2806, 1988.
 - [12] J. Almkvist and A. Karlsson, "Galectins as inflammatory mediators," *Glycoconjugate Journal*, vol. 19, no. 7–9, pp. 575–581, 2002.
 - [13] G. A. Rabinovich, L. G. Baum, N. Tinari et al., "Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?" *Trends in Immunology*, vol. 23, no. 6, pp. 313–320, 2002.
 - [14] I. Cortegano, V. Del Pozo, B. Cárdena et al., "Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types," *Journal of Immunology*, vol. 161, no. 1, pp. 385–389, 1998.
 - [15] V. Del Pozo, M. Rojo, M. L. Rubio et al., "Gene therapy with galectin-3 inhibits bronchial obstruction and inflammation in antigen-challenged rats through interleukin-5 gene down-regulation," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 166, no. 5, pp. 732–737, 2002.
 - [16] E. López, V. Del Pozo, T. Miguel et al., "Inhibition of chronic airway inflammation and remodeling by Galectin-3 gene therapy in a murine model," *Journal of Immunology*, vol. 176, no. 3, pp. 1943–1950, 2006.
 - [17] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray," *Science*, vol. 270, no. 5235, pp. 467–470, 1995.
 - [18] D. J. Lockhart, H. Dong, M. C. Byrne et al., "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays," *Nature Biotechnology*, vol. 14, no. 13, pp. 1675–1680, 1996.
 - [19] A. Subramanian, P. Tamayo, V. K. Mootha et al., "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 43, pp. 15545–15550, 2005.
 - [20] J. M. Vaquerizas, L. Conde, P. Yankilevich et al., "GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 2, pp. W616–W620, 2005.
 - [21] B. M. Bolstad, R. A. Irizarry, M. Åstrand, and T. P. Speed, "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias," *Bioinformatics*, vol. 19, no. 2, pp. 185–193, 2003.
 - [22] R. C. Gentleman, V. J. Carey, D. M. Bates et al., "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics," *Genome Biology*, vol. 5, no. 10, article R80, 2004.
 - [23] Y. Benjamini and Y. Hochberg, "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing," *Journal of the Royal Statistical Society B*, vol. 57, no. 1, pp. 289–300, 1995.
 - [24] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2T method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
 - [25] F. Al-Shahrour, L. Arbiza, H. Dopazo et al., "From genes to functional classes in the study of biological systems," *BMC Bioinformatics*, vol. 8, article 114, 2007.
 - [26] J. Elliott and J. A. Johnston, "SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis," *Trends in Immunology*, vol. 25, no. 8, pp. 434–440, 2004.
 - [27] Y. I. Seki, K. Hayashi, A. Matsumoto et al., "Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 20, pp. 13003–13008, 2002.
 - [28] C. E. Egwuagu, C. R. Yu, M. Zhang, R. M. Mahdi, S. J. Kim, and I. Gery, "Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 7, pp. 3181–3187, 2002.
 - [29] M. Kubo and H. Inoue, "Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in Th2 cells evokes Th2 cytokines, IgE, and eosinophilia," *Current Allergy and Asthma Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 32–39, 2006.
 - [30] H. S. McGee, A. L. Stallworth, T. Agrawal, Z. Shao, L. Lorence, and D. K. Agrawal, "Flt3-ligand decreases Th17 cells and SOCS proteins in the lung of house dust mite-sensitized and challenge mice," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 43, no. 5, pp. 520–529, 2010.
 - [31] J. Knisz and P. B. Rothman, "Suppressor of cytokine signaling in allergic inflammation," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 119, no. 3, pp. 739–745, 2007.
 - [32] R. I. Zuberi, D. K. Hsu, O. Kalayci et al., "Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma," *American Journal of Pathology*, vol. 165, no. 6, pp. 2045–2053, 2004.

Research Article

Suppressors of Cytokine Signaling 3 Expression in Eosinophils: Regulation by PGE₂ and Th2 Cytokines

**Esther López,^{1,2} María Paz Zafra,¹ Beatriz Sastre,^{1,2} Cristina Gámez,^{1,2}
Mar Fernández-Nieto,^{2,3} Joaquín Sastre,^{2,3} Carlos Lahoz,^{1,2} Santiago Quirce,^{2,4}
and Victoria Del Pozo^{1,2}**

¹Immunology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Avenida Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

²CIBER of Respiratory Diseases (CIBERES) ISCIII, Madrid, Spain

³Allergy Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), 28040 Madrid, Spain

⁴Allergy Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Victoria Del Pozo, vpozo@fjd.es

Received 16 November 2010; Revised 2 March 2011; Accepted 17 March 2011

Academic Editor: Hiroshi Nakajima

Copyright © 2011 Esther López et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis (NAEB) are respiratory disorders characterized by a predominance of Th2 cells and eosinophilic inflammation. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins play an important role in Th2-mediated allergic responses through control of the balance between Th1 and Th2 cells, particularly, SOCS3 and SOCS5. The aim of this study was to analyze SOCS expression in human peripheral blood eosinophils from patients with asthma, NAEB and healthy controls. SOCS expression in eosinophils from subjects was demonstrated by different techniques. Results showed that expression of SOCS3 in eosinophils and CD4 T cells from patients was higher than in healthy subjects. In addition, we demonstrated that prostaglandin E₂ (PGE₂) and Th2 cytokines are able to upregulate SOCS3 production in eosinophils and attenuate its degranulation. In conclusion, eosinophils are able to transcribe and translate SOCS3 protein and can contribute to the regulation of the Th1/Th2 balance through SOCS3 production.

1. Introduction

Th2 respiratory disorders, such as asthma, allergic rhinitis, and nonasthmatic eosinophilic bronchitis (NAEB), have been major public health problems in the last two decades. NAEB was originally described by Gibson et al. [1] and has subsequently been recognized as an important cause of chronic cough [2]. Asthma and NAEB are associated with a similar T-helper type 2 cytokine-driven airway inflammation [3, 4]. However, airway hyperresponsiveness and variable airflow obstruction, which are the hallmarks of asthma, are not present in NAEB.

Inflammatory mediators and cytokines play essential roles in the control of immune system; they not only act as growth factors, but also regulate the differentiation, maintenance, and activation of naïve effectors and the memory state of immune cells [5]. The Th1/Th2 balance determines the nature of an immune response [6]; however,

the mechanism by which Th1 and Th2 cytokines cross-regulate the immune response remains unclear.

In both physiologic and pathologic conditions, cytokine function is strictly controlled. Cytokine signaling pathways are negatively regulated by the so-called suppressor of cytokine signaling (SOCS) family of proteins. There are eight members of the CIS-SOCS family [7]. Several reports have indicated that SOCS proteins are necessary for regulation of normal immune responses [8]. SOCS proteins not only act as simple negative-feedback regulators, but they are also involved in fine-tuning the immune response and in the crosstalk of complicated cytokine signal networks. Since cytokines are constantly present in the microenvironment of immune cells, signal regulation by SOCS-family proteins may be important for the proper progress, remission, and relapse of an immune response. Therefore, SOCS1, SOCS3, and SOCS5 participate in CD4⁺ Th-cell differentiation and in Th1/Th2-cell balance [9]. SOCS3 is predominantly

expressed in Th2 cells and inhibits Th1 differentiation [10–12]. Conversely, SOCS5 is predominantly expressed in Th1 cells and inhibits Th2 differentiation [8, 13]. The cyclooxygenase product, prostaglandin E_2 (PGE_2), is produced by several cells in human airways, including the epithelium [14] and smooth muscle [15]; PGE_2 is produced during inflammatory responses, and increased levels of PGE_2 mediate some of the cardinal features of inflammation. In contrast, several studies suggest that in addition to its pro-inflammatory actions, PGE_2 may also exert strong anti-inflammatory and bronchoprotective effects in patients with bronchial asthma [15–18]. Recently, it has been demonstrated that prostaglandins are capable of inducing SOCS3 expression [19–21]; moreover, we have reported that PGE_2 is present in lung from subjects with NAEB and asthma [22], diseases that are characterized by high eosinophil counts. Thus, PGE_2 may represent an endogenous protective mechanism in the airways as a modulator of immune responses.

The SOCS implication in Th1/Th2 balance regulation and allergic phenotypes suggests a range of new therapeutic strategies that could reduce Th2-induced inflammation and eosinophilia. For these reasons, we determined if eosinophils, the characteristic inflammatory cells of asthma and NAEB, are able to express mRNA and synthesize SOCS3 protein. In addition, we tested the hypothesis that both Th2 cytokines and PGE_2 upregulate SOCS3 expression in eosinophils. This study reports SOCS3 production by eosinophils, a process which is regulated by cytokines and PGE_2 .

2. Materials and Methods

2.1. Subjects. Eight subjects with NAEB, 6 subjects with asthma, and 9 healthy control subjects were recruited from the Fundación Jimenez Díaz Allergy clinic outpatients and staff. The investigation has been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethical Committee from Fundación Jimenez Díaz, and informed consent of all participating subjects was obtained. Blood samples were obtained from adult donors. Total IgE levels were measured using the immunoCAP immunoassay system (Phadia, Uppsala, Sweden) and PGE_2 levels by ELISA kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

Subjects with asthma had a consistent history of the disease and objective evidence of asthma (as defined by the American Thoracic Society) [23] for at least 6 months. These patients either showed a greater than 12% improvement in FEV₁, 10 minutes after administration of 500 μ g of inhaled terbutaline, or had methacholine airway hyperresponsiveness (PC₂₀ methacholine <16 mg/mL). Patients with asthma had mild persistent disease [24] and were clinically stable. None had a history of respiratory infection for at least the 6-week period preceding the study. We included both atopic and nonatopic patients in the asthmatic group, since no differences in the parameters assessed for both sets of patients had been observed previously.

The subjects with NAEB had an isolated cough lasting >8 weeks, no symptoms suggesting variable airflow

obstruction, normal spirometric values, a methacholine PC₂₀ value >16 mg/mL, a normal chest radiograph, and sputum eosinophilia (sputum eosinophils >3%).

For patients who were receiving inhaled corticosteroids, the drugs were withdrawn for at least 2 weeks before sputum induction. No patient was receiving oral corticosteroids (for at least 6 months prior to the study), leukotriene receptor antagonists, aspirin, or any other cyclooxygenase inhibitor.

2.2. Eosinophil and CD4 T Cell Purification. Eosinophils and CD4 T cells were purified from peripheral blood of healthy control and patient donors using a two-step procedure. First, the polymorphonuclear and mononuclear cell fractions were obtained by Ficoll gradient centrifugation. The second step involved removal of residual cells from the polymorphonuclear cell fraction. For eosinophil purification, CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD123, and glycoprotein A positive cells were discarded by a magnetic bead separation technique, as described in the manufacturer's procedure (EasySep; StemCell Technologies, Vancouver, Canada). The CD4 T cell purification from the mononuclear fraction was achieved using a similar protocol by removing monocytes, CD8 T cells, B cells and others by a magnetic bead separation technique, using CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , and glycoprotein A antibodies. Remaining cells were CD4 T cells. The viability and purity of the cells were assessed by staining with trypan blue and flow cytometry, respectively. Eosinophils are defined as CCR3⁺CD16⁺ cells, so we measured purity of eosinophils staining cells with fluorochrome-conjugated anti-CCR3 (CCR3-FITC) and anti-CD16 (CD16 PE) antibodies by flow cytometry. The viability and purity were routinely >98%.

2.3. Bronchial Biopsies. Bronchoscopies were performed (healthy controls $n = 2$, asthma $n = 2$, and NAEB $n = 4$) using a flexible fiberoptic or rigid bronchoscope. Biopsies were taken from the subcarinae of the left or right lower lobe using fenestrated forceps and finally immersed in Trizol reagent and frozen at -80°C until use.

2.4. Eosinophil Culture. Purified eosinophils from healthy control, asthmatics, and NAEB subjects were plated at 1×10^6 cells/mL in RPMI 1640 with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin at 37°C and 5% CO₂. Cells were then treated with different doses of recombinant human IL-4 or IL-5 (0.1, 1, and 10 ng/mL; Bender MedSystem, Vienna, Austria) or IL-13 (0.5, 10 and 50 ng/mL; R&D System, MN, USA) or PGE_2 (10^{-4} and 10^{-6} M; Cayman Chemical Company, Ann Arbor MI, USA) or IFN γ (5, 10, 20 ng/mL; R&D System, MN, USA) for different time periods (30–120 min). All conditions were performed in triplicate, in at least 4 independent experiments.

2.5. Confocal Microscopy. Purified eosinophils (5×10^5 cells/mL; 100 μ L/slide) were adhered to slides by cytocentrifugation (Shandon Southern Instruments, Waltham, MA, USA). Adhered eosinophils were fixed and permeabilized with

methanol and 0.1% Triton, respectively, and blocked with 4% BSA and 6% normal goat serum in PBS, washed, then incubated with SOCS3 antibody at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) or rabbit IgG as control, during 1 hour at room temperature. The slides were washed again and then exposed to Texas Red conjugated goat antirabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) overnight at 4°C. The slides were observed by confocal microscopy (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The fluorescence intensity over the area of a single cell was integrated, and nonspecific fluorescence (negative control) was subtracted. Net fluorescence intensity was divided by the average area of the eosinophil in μm^2 and expressed as fluorescence intensity units (FIU)/ μm^2 . For statistical analysis, average net intensity values were calculated from a minimum of 100 cells per sample.

2.6. Immunocytochemistry. Slides with purified eosinophils were treated with methanol and 3% hydrogen peroxide in PBS to block endogen peroxidase. Then, slides were blocked with 4% BSA and 6% normal goat serum in PBS, washed, and then exposed to SOCS3 antibody at 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or rabbit IgG as control for 30 min at room temperature, and stained with the LSAB and System HRP Kit, according to the manufacturer's instructions (DAKO, Carpinteria, CA, USA). The slides were then lightly stained with hematoxylin and examined.

2.7. Western Blot Analysis. The lysates from purified eosinophils (10 μg total protein), and 5 μg recombinant SOCS3 (rSOCS3) as positive control (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), were resolved on SDS-PAGE and analyzed by Western blotting, using a 1:200 dilution of SOCS3 antibody or rabbit IgG as isotype control. The secondary antibody, HRP-conjugated goat antirabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), was diluted 1:1000.

Chemiluminescent protein bands were detected by an ECL detection system (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's protocol. The protein concentration was estimated according to the method of Bradford [25].

2.8. RNA Extraction and Real-Time Quantitative PCR of SOCS3 and SOCS5. Total RNA was extracted from eosinophils, CD4 T cells, and bronchial biopsies according to TRIzol reagent protocol (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Bronchial biopsies were homogenized previously. Two micrograms of RNA were DNase treated, followed by reverse transcription according to the kit instructions (Applied Biosystems, Warrington, UK). TaqMan PCR was performed using a 20 μL final reaction volume containing 10 μL of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA), 1 μL of 20X Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix, and 9 μL of cDNA diluted in RNase-free water. Each assay was performed in triplicate. The PCR conditions used in all reactions were 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, with 40 two-step cycles (95°C for 15 s and 60°C for 60 s). Assays-on-Demand Gene Expression primers specific for SOCS3, SOCS5, and rRNA (used

as an endogen) were obtained from Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com/>). The genes analyzed in this study were examined for their relative expression by means of the $\Delta\Delta C_T$ method [26].

2.9. Eosinophil Degranulation. To determine the release of eosinophil peroxidase (EPO) from purified human eosinophils, cells were resuspended in assay buffer (PBS, 0.1% BSA, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose; pH: 7.4) at 1×10^6 cells/mL, mixed with cytochalasin B (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and 50- μL aliquots were loaded into the wells of a 96-well microplate. Cells were stimulated with 20 μL of C5a (300 nM) for 20 min at 37°C. Thereafter, 60 μL of H_2O_2 (1 mM) were added to each well to start the peroxidase reaction. To detect the reaction, 70 μL of 2.8 mM tetramethylbenzidine was used. Following incubation for 1 min at room temperature, the peroxidase reaction and the color development were stopped with 4 M acetic acid [27]. Microplates were analyzed on a bench reader at a wavelength of 630 nm. Data were expressed as the percentage of the maximal control response (C5a at 300 nM).

2.10. Statistical Analysis. The subject characteristics were described using descriptive statistics and expressed as geometric mean and standard deviation (SD), and median and range.

Results were compared and evaluated using the Kruskal Wallis test and posttest Dun's multiple comparison tests. Correlation coefficients and statistical significance were determined using Spearman correlation coefficient. Statistical significance was recognized at $P \leq .05$. Statistical analyses were performed using GraphPad InStat3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Clinical Characteristics of the Subjects. Eight subjects with NAEB, six subjects with asthma, and nine healthy control subjects were recruited from the Fundación Jiménez Díaz Allergy Clinic outpatients and staff. The subjects' clinical characteristics are shown in Table 1.

The age of asthma and NAEB patients was very similar (41.75 ± 8.94 and 38.55 ± 12.06 years, resp.), and no differences existed in the evaluated parameters as a function of age or gender in adult patients with asthma or NAEB.

Predicted values for FEV₁ fell within a normal range, although asthmatic patients showed a significant decrease compared to healthy control subjects and NAEB patients ($P < .05$). The median percentage of eosinophils on whole blood was significantly higher in the subjects with NAEB and asthma than in healthy control subjects (4.4%, 2.66%, and 0.14%, resp.; $P < .01$ and $P < .05$). In concordance with these data, sputum eosinophils were also statistically higher in NAEB and asthma patients than in healthy controls (15.9%, 15.1%, and 2.1% resp.). No significant differences were observed in the eosinophil count between patients with asthma and patients with NAEB, as shown in Table 1. The IgE level in patients with NAEB and asthma was significantly higher than in healthy controls ($P < .05$). There was

TABLE 1: Clinical characteristics of study subjects.

| | Healthy controls | Nonasthmatic eosinophilic bronchitis (NAEB) | Asthma |
|---|------------------|---|-------------------|
| N | 9 | 8 | 6 |
| Age (years) | 23 (20–30) | 40 (31–55) | 37(21–61) |
| Male (%) | 4 (44.4%) | 4 (50%) | 3 (50%) |
| Atopy (%) | 0 | 5 (62.5%) | 3 (50%) |
| FEV ₁ predicted ^a | 105 (100–129) | 108.95 (96–115) [§] | 99.47 (73–110)* |
| FEV ₁ /FVC ^a | 85 (79–92) | 80.6 (74.5–89.6) | 78.91 (77.6–95.2) |
| Total IgE (kU/L) ^a | 21.15 (4.52–144) | 163 (34.50–605)* | 65.2 (57.6–360)* |
| Eosinophil count (%) | 0.14 (0–3.32) | 4.40 (1.5–8.39) [†] | 2.66 (1.34–7.92)* |
| Sputum eosinophils (%) ^a | 2.1 (0.1–9.7) | 15.9 (2–35) | 15.1 (0.6–52.3) |
| PGE ₂ in sputum supernatant (pg/mL) ^a | 2.89 (0.78–5.28) | 15.582 (3.81–1336)* | 33.8 (12.9–54.7) |

FVC: forced vital capacity, FEV₁: forced expiratory volume in the first second.

^aMedian (range).

* $P < .05$ (versus healthy control; Kruskal Wallis test; posttest Dunn's multiple comparison test).

[†] $P < .01$ (versus healthy control; Kruskal Wallis test; post test Dunn's multiple comparison test).

[§] $P < .05$ (versus asthma patients; Kruskal Wallis test; post test Dunn's multiple comparison test).

a tendency toward higher levels of PGE₂ in patients with NAEB ($P < .05$) and asthma (not significant).

3.2. SOCS Gene Expression Correlates with Th2 Respiratory Disorders. Asthma and NAEB are allergic diseases characterized by massive infiltration of eosinophils and T cells secreting Th2 cytokines into the pathologic site. We therefore examined whether purified CD4 T cells (>98%) from patients with NAEB and asthma had higher levels of SOCS3 gene expression as consequence of the preferential development of Th2 cells. Expressions of SOCS3 and SOCS5 mRNA were analyzed by real-time quantitative PCR in peripheral CD4 T cells from adult patients with NAEB, asthma and healthy controls.

The expression of SOCS3 mRNA in patients with asthma and NAEB was significantly higher than in healthy individuals ($P < .05$ and $P < .01$, resp.; Figure 1(a)); however, no significant difference was observed in the expression of SOCS5 between patients and controls (Figure 1(b)).

3.3. Eosinophils from Donors with Th2 Respiratory Disorders Exhibit Increased SOCS3 mRNA Expression in Comparison to Normal Eosinophils. Because the accumulation of eosinophils is a feature of both asthma and NAEB, we determined if eosinophils are able to transcribe and translate mRNA for SOCS3. Thus, SOCS mRNA expression in purified eosinophils (>98%) from patients and healthy individuals was studied. SOCS3 mRNA levels in patients with NAEB were higher than in healthy controls ($P < .01$, Figure 1(c)); although there was a weak SOCS3 level increase in patients with asthma (1.51-fold), it did not reach statistical significance versus healthy subjects. SOCS5 expression was higher in eosinophils from patients, but there were no significant differences between the patient groups and control subjects (Figure 1(d)). As elevation of serum IgE is a characteristic of patients with NAEB and asthma, we determined the correlation between serum IgE and the expression of SOCS3. Individuals with a high expression of SOCS3 had high levels of serum IgE ($P < .03$, $r = 0.5$; data not shown).

3.4. Differential Expression of SOCS3 mRNA between Bronchial Biopsies from Asthmatics and NAEB Patients. The lung undergoes dramatic changes in asthma and NAEB. Because SOCS3 is involved in the regulation of the Th1/Th2 axis in allergic diseases, we measured the SOCS3 mRNA expression in bronchial biopsies from healthy controls, asthmatics, and NAEB subjects (Figure 1(e)).

Our results showed that SOCS3 mRNA expression in bronchial biopsies was strikingly increased (12.7-fold higher) in subjects with NAEB as compared with asthmatics ($P < .05$).

3.5. Identification of SOCS3 in Eosinophils by Immunocytochemistry, Confocal Microscopy, and Immunoblotting. Immunocytochemistry, confocal microscopy, and immunoblotting were performed to confirm the expression of SOCS3 in eosinophils. Figure 2 shows an example of highly purified eosinophil preparations from asthmatics (Figures 2(b) and 2(f)), NAEB (Figures 2(c) and 2(g)) and healthy subjects (Figures 2(d) and 2(h)), in which eosinophils clearly show the characteristic bilobular nuclei of mature blood eosinophils. There were eosinophils positively immunostained for SOCS3 in asthmatics and NAEB samples, as indicated by the expression of the brown reaction product (Figures 2(b) and 2(c), resp.) or red fluorescence (Figures 2(d) and 2(h), resp.). The expression of SOCS3 protein measured as fluorescence intensity was higher in patients with NAEB (30.56 ± 8.81 FIU/ μm^2 ; Figure 2(g)) than in asthmatics (12.35 ± 5.5 FIU/ μm^2 ; Figure 2(f)) whereas in healthy controls was hardly intense (5.765 ± 2.64 FIU/ μm^2 Figure 2(h)). Similar results were obtained by immunocytochemistry (Figures 2(c) and 2(b)).

When we examined the distribution of SOCS3 in eosinophils, using both techniques we showed that SOCS3 immunoreactivity or immunofluorescence was largely confined to the eosinophil cytoplasmic compartment with granular expression pattern (Figures 2(b), 2(c), 2(f), and 2(g)). The negative control was treated with HRPO isotype antibody, and the absence of specific staining is revealed

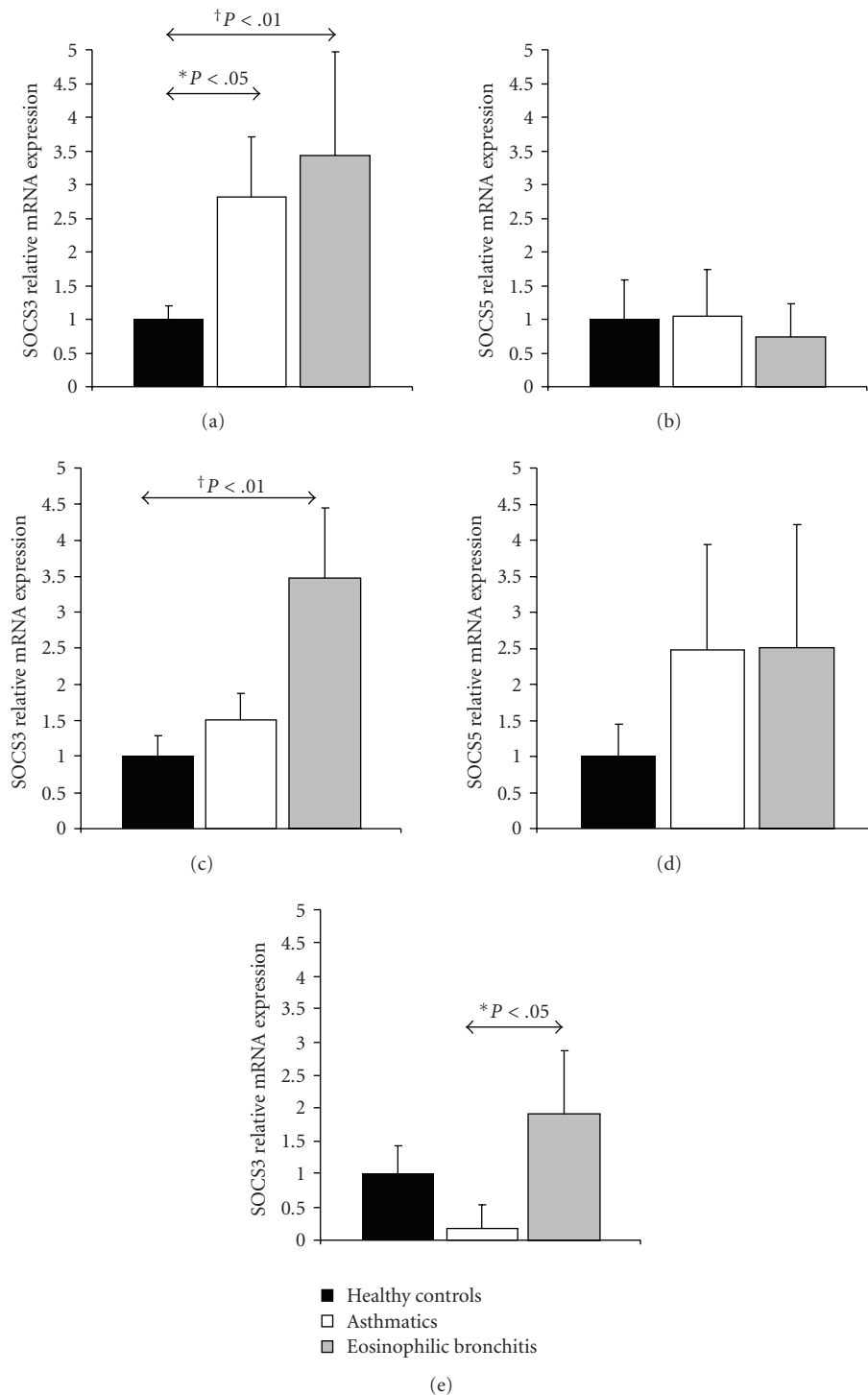


FIGURE 1: Semiquantitative expression of SOCS3 and SOCS5 genes in peripheral blood purified CD4 T cells and eosinophils. Relative mRNA levels of SOCS3 and SOCS5 in CD4 T cells ((a) and (b)), and eosinophils ((c) and (d)) of healthy controls, asthmatic and NAEB patients were determined by real-time quantitative PCR. Values were normalized with rRNA gene used as an endogen. Black boxes represent the healthy control group (mean \pm SD, $n = 9$), white boxes represent the asthmatic patient group (mean \pm SD, $n = 6$), and lineated boxes represent the NAEB group (mean \pm SD, $n = 8$). Significant differences in the levels of SOCS3 expression in CD4 T cells were obtained for asthmatic and NAEB patients versus the healthy control group ($^*P < .05$ and $^{\dagger}P < 0.01$, resp.). In eosinophils, the SOCS3 level was significantly higher in NAEB patients than in healthy controls ($^{\dagger}P < .01$). In the case of SOCS5, no significant differences were found between the groups. (e) SOCS3 mRNA levels in bronchial biopsies from healthy controls (mean \pm SD, $n = 2$), asthmatics (mean \pm SD, $n = 2$), and NAEB patients (mean \pm SD, $n = 4$). Significant differences in the levels of SOCS3 expression were obtained for asthmatic versus NAEB patients ($^*P < .05$). The results represent relative gene expression, as determined by the $\Delta\Delta C_T$ method.

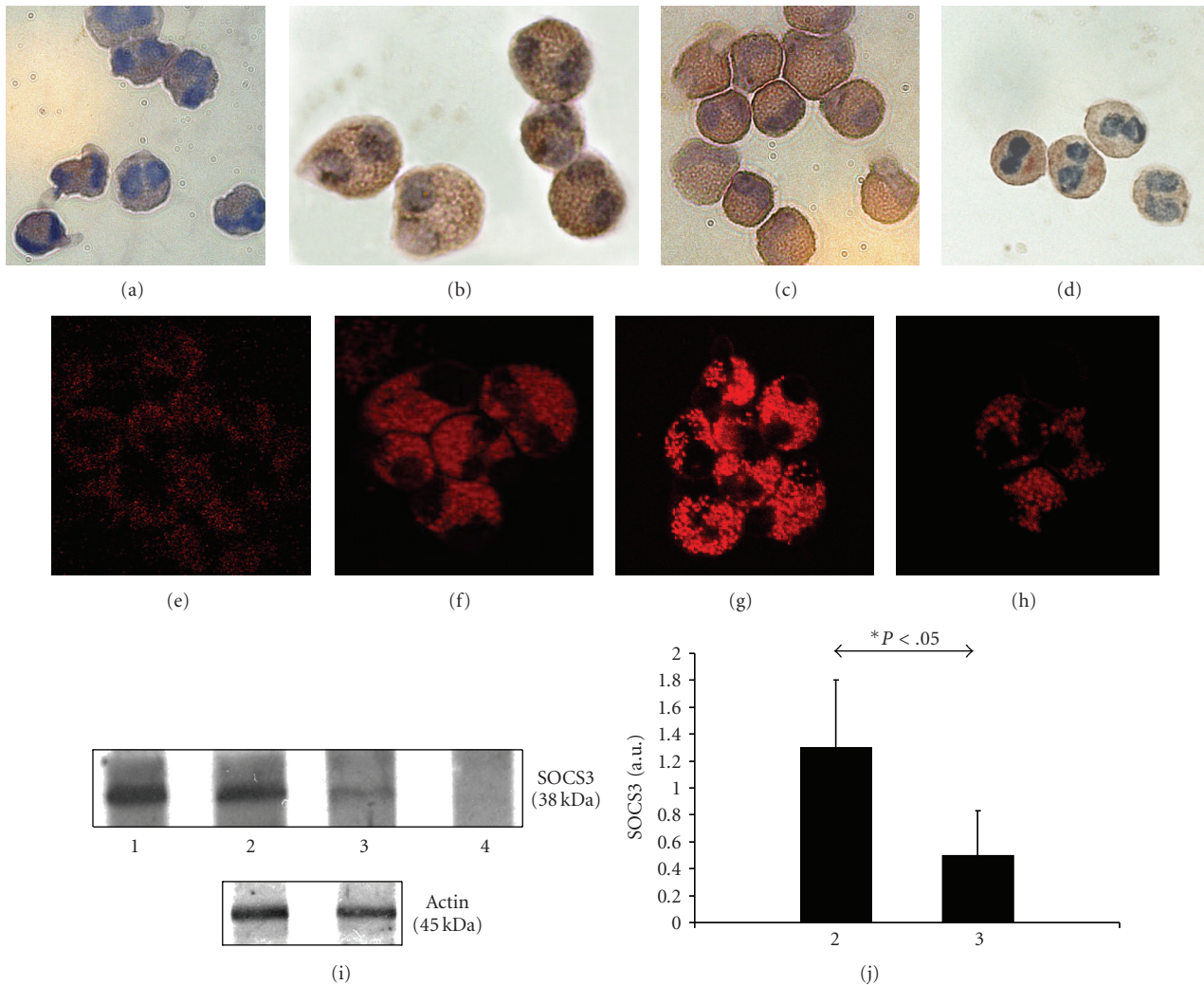


FIGURE 2: SOCS3 expression in peripheral blood eosinophils from Th2 patients analyzed by immunohistochemical, immunofluorescence, and Western blot techniques. Eosinophils from asthmatic and NAEB patients within healthy controls were adhered to slides and incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG against SOCS3 antibody ((b), (c), and (d)) or rabbit IgG as a control (a), and Texas Red conjugated goat anti-rabbit IgG against SOCS3 antibody ((f), (g), and (h)) or rabbit IgG as a control (e). The slides were observed by optical ((a), (b), (c), (d)) or confocal ((e), (f), (g) and (h)) microscopy. Western blot analysis of the cytosolic extract of purified eosinophils was achieved using antibody against SOCS3 (i). Lane 1: recombinant SOCS3 was loaded as a positive control; lane 2: eosinophil lysate from NAEB patients; lane 3: eosinophil lysate from healthy control patients; lane 4: isotype negative control. The picture is a representative example of 5 individuals, all displaying similar results. (j): SOCS3 bands were quantified by densitometry and corrected by actin expression; data are expressed as the mean \pm SD, $n = 5$, $*P < .05$ (2: NAEB; 3: healthy patients).

Figure 2(a). Also, Figure 2(e) represents images taken from Texas Red isotype control, and demonstrates that there was negligible autofluorescence or nonspecific binding in these samples.

Finally, SOCS3 protein production by eosinophils was verified by Western blot, using SOCS3 antibody (Figure 2(i)). The result pointed out a protein band with a similar molecular weight to the commercial positive control (rSOCS3, 38 kDa) in the protein lysates of highly purified eosinophils from patients with NAEB and control subjects. The SOCS3 levels were quantified by densitometry and normalized to actin levels (Figure 2(j)), and the data demonstrated that the quantified band was statistically more intense in

eosinophils from patients compared to healthy individuals ($P < .05$). This data confirm the SOCS3 protein expression in eosinophils. Figure 2 shows a representative example of 5 individuals, all of whom display similar results.

3.6. Th2 but Not Th1 Cytokines Stimulate SOCS-3 mRNA Expression in Eosinophils. The increased expression of SOCS3 in eosinophils from patients with NAEB and asthma compared with controls is probably due to factors that could regulate SOCS3 expression in these cells under disease conditions. For this reason, *in vitro* effects of Th2 and Th1 cytokines in SOCS3 mRNA expression in eosinophils were assessed using real-time quantitative PCR.

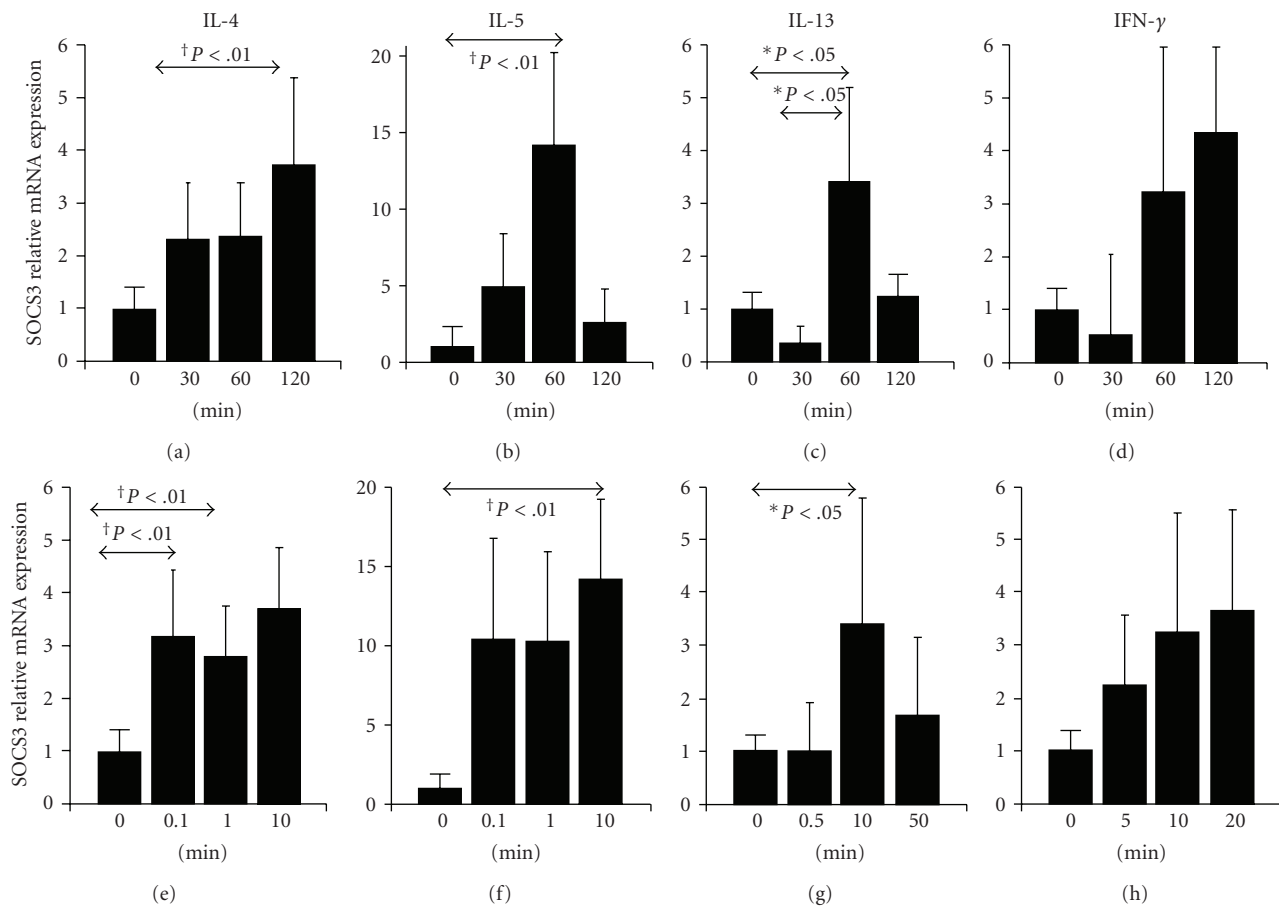


FIGURE 3: SOCS3 expression in peripheral blood eosinophils treated with Th2 cytokines and IFN- γ . Purified eosinophils from healthy donors were cultured with 10 ng/mL of IL-4 (a), IL-5 (b), IL-13 (c), or IFN- γ (d) for different periods of time. Dose-response curves were performed with IL-4, IL-5, IL-13, or IFN- γ (e)–(h) at maximal time response; SOCS3 mRNA was measured by real-time quantitative PCR. The results are expressed as a fold induction relative to untreated eosinophils, and significant differences are indicated. Data represent the geometric mean \pm SD from four individuals, and each measure was performed in triplicate.

The treatment of eosinophils from healthy subjects with recombinant human IL-4, IL-5, or IL-13 (Th2 cytokines) induces upregulation of SOCS3 mRNA expression in a time-dependent manner, with higher levels of SOCS3 mRNA at 120 min for IL-4 (Figure 3(a)) and at 60 min for IL-5, and IL-13 (Figures 3(b) and 3(c)). Furthermore, SOCS3 mRNA expression was significantly enhanced by the incubation with human recombinant IL-4, IL-5, or IL-13 in a dose-dependent manner (Figures 3(e), 3(f), and 3(g)). Our results showed that SOCS3 production was strikingly increased (14.10-fold; Figure 3(f)) in IL-5-induced eosinophils as compared with IL-4-, or IL-13-induced eosinophils (3.71-fold; Figure 3(e) and 3.39-fold; Figure 3(g), resp.). In contrast, when eosinophils were cultured with IFN- γ , typically secreted by Th1 cells, SOCS3 expression was not statistically affected at any dose or time assayed (Figures 3(d) and 3(h)). Similar results came out when stimulation was carried out with IL-2, another well-known Th1 cytokine (data not shown). Collectively, these results demonstrate that SOCS3 expression is activated in response to increased amounts of Th2 cytokines.

We wanted to compare the effects of Th2 cytokines on the expression of SOCS3 mRNA in eosinophils from healthy controls, asthmatics, and NAEB patients. When eosinophils from asthmatics and NAEB patients were treated during optimal period of time with IL-4, the relative level of SOCS3 mRNA expression was significantly lower than in healthy controls with the same treatment (0.8 ± 0.3 , 0.6 ± 0.6 , and 3.71 ± 1.2 resp., $P < .05$, Figure 4). Similar results were obtained when eosinophils were cultured with IL-5 (3.02 ± 2.2 , 1.86 ± 0.6 and 14.11 ± 4.2 , resp., $P < .05$, Figure 4). However, stimulation with IL-13 did not significantly modify SOCS3 mRNA expression.

3.7. PGE₂ Treatment Produces Increased SOCS3 mRNA Expression in Eosinophil Cultures. Because it has been reported that PGE₂ upregulates SOCS3 gene expression in different cell types, we examined the effect of PGE₂ on SOCS3 expression in eosinophils from healthy subjects. We tested different doses of PGE₂ (10^{-4} and 10^{-6} M), and SOCS3 gene activation was determined by real-time quantitative PCR. After treatment of eosinophils with PGE₂, SOCS3 mRNA

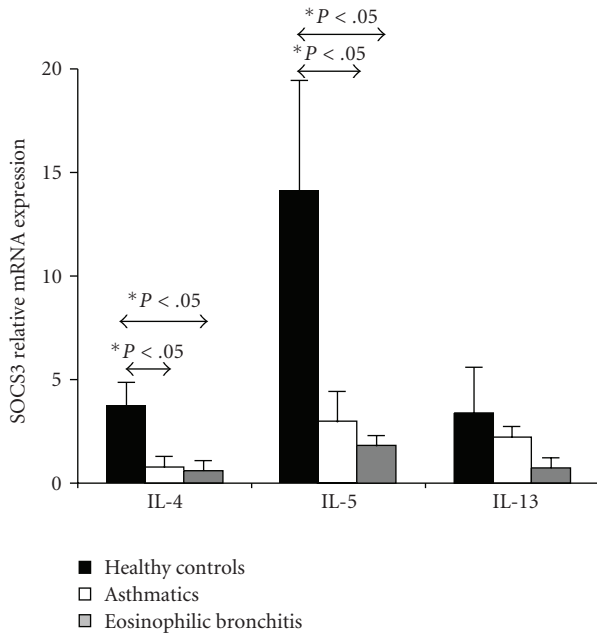


FIGURE 4: SOCS3 mRNA expression in Th2-stimulated eosinophils from healthy controls, asthmatics, and NAEB patients. Eosinophils from healthy controls, asthmatics, and NAEB patients were cultured with 10 ng/mL of IL-4 or IL-5, or IL-13 during 60 min. SOCS3 mRNA was measured by real-time quantitative PCR. The results are expressed as a fold induction relative to untreated eosinophils, and significant differences are indicated. Data represent the geometric mean \pm SD from three individuals, and each measure was performed in triplicate.

expression was upregulated at 60 and 120 min (Figure 5(a)). This regulation was dose dependent, and significant differences were found compared with the control eosinophils (Figure 5(b)). PGE_2 , 10^{-4} M and 10^{-6} M, increased SOCS3 gene expression by 7.76- and 5.58-fold, respectively.

These data indicate that PGE_2 induces SOCS3 mRNA expression, suggesting that PGE_2 can be a regulatory metabolite of SOCS3 protein production in eosinophils.

3.8. Th2 Cytokines and PGE_2 Inhibit Eosinophil Degranulation. We assessed the biological significance of SOCS3 augmentation in eosinophils by examining the effects of Th2 cytokines and PGE_2 in eosinophil degranulation. We observed that C5a-induced release of EPO was significantly attenuated by both Th2 cytokines and PGE_2 (Figure 6). All inhibitions obtained were statistically significant and is ranged between 32.5% and 77%, obtained with PGE_2 and IL-5, respectively.

4. Discussion

Our results reveal that eosinophils are able to transcribe and express SOCS3 at the protein level, and this production is upregulated by IL-4, IL-5, IL-13, and PGE_2 . In addition, SOCS3 production was increased in patients with NAEB.

These data suggest that eosinophils can contribute to the regulation of the inflammatory response through SOCS3 production.

This study examined SOCS protein expression in blood eosinophils from patients with two Th2 conditions (asthma and NAEB). These respiratory disorders are characterized by the recruitment and activation of inflammatory cells, including eosinophils and lymphocytes, which produce cytokines [22]. However, the amplitude and duration of the response depend on precise fine-tuning and coordination of immune cell responses, and these aspects are regulated by endogenous feedback regulators of cytokine activities. Prominent among this class of intracellular regulators are members of the SOCS proteins family [5, 7]. Significant interest in the SOCS family stems from the belief that SOCS proteins may integrate multiple cytokine signals and mediate cross-communication between antagonistic cytokines elaborated by different cells through inhibitory effects on cytokine receptors and signaling molecules.

SOCS proteins exert negative regulation of cytokine signaling in a variety of ways and are known to be involved in the pathogenesis of many inflammatory diseases. Hence, some members of the SOCS protein family, and SOCS1, SOCS3, and SOCS5 in particular, participate in regulation of the Th1/Th2 balance [28, 29].

According to this, the evaluation of SOCS3 in bronchial biopsies from healthy controls, asthmatics, and NAEB subjects ascertained the expression at mRNA level of this negative regulator. Notably, this expression was enhanced in bronchial biopsies from NAEB subjects in comparison with those from healthy control or asthmatics.

Considering that eosinophils play a prominent pro-inflammatory role in allergic airway inflammation, and noting that other authors have recently described the SOCS3 expression in different cellular types, such as macrophages and microglia [30], we determined if blood eosinophils are able to express SOCS3 and SOCS5 at the protein level and thus contribute to regulate cytokine balance in NAEB and asthma, conditions in which eosinophils are one of the most important cell types.

We have demonstrated that blood eosinophils express SOCS proteins. SOCS3 and SOCS5 gene expressions were detected by real-time quantitative PCR, and SOCS3 protein was detected in the cytosol of blood eosinophils with granular expression pattern by immunohistochemistry, immunofluorescence, and immunoblotting.

Moreover, blood eosinophils from patients with Th2 disorders exhibit higher levels of SOCS3 mRNA than healthy subjects. These data suggest that eosinophils may play an important role in regulating inflammation in respiratory disorders through SOCS3 expression. We tested the effects of Th2 cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13) on the expression of SOCS3 in blood eosinophils *in vitro*, and we showed upregulation of SOCS3 expression in a time- and dose-dependent manner, thus corroborating SOCS-3 activation in response to the Th2 environment under disease conditions. We also found that SOCS-3 expression in blood eosinophils from patients with asthma and NAEB was correlated with serum IgE levels ($r = 0.5$, $P < .03$). This result can

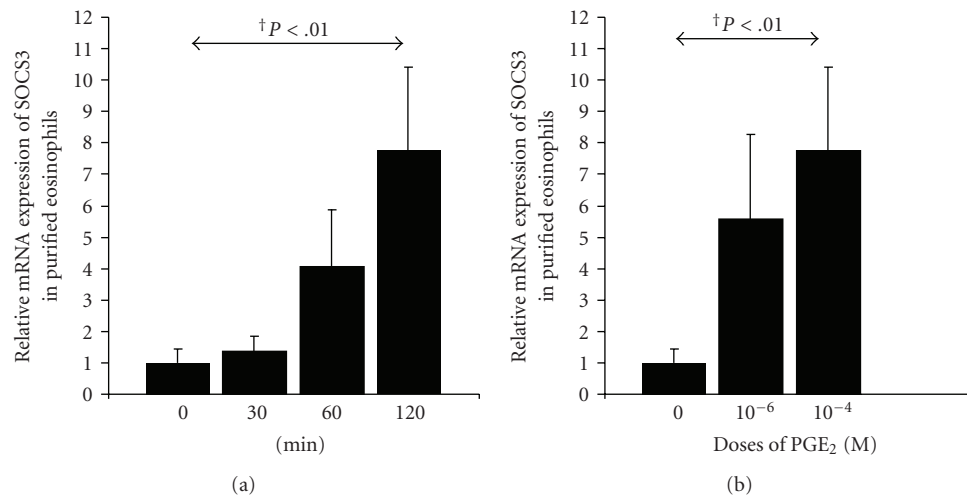


FIGURE 5: PGE₂ stimulation of SOCS3 mRNA expression. Purified eosinophils from healthy donors were cultured with 10⁻⁴ M of PGE₂ for up to 120 min (a), and with increasing doses of PGE₂ at 120 min (b), and SOCS3 mRNA was measured by real-time quantitative PCR. The results are expressed as a fold induction relative to untreated eosinophils, and significant differences are indicated. Data represent the geometric mean \pm SD from four individuals, and each measure was performed in triplicate.

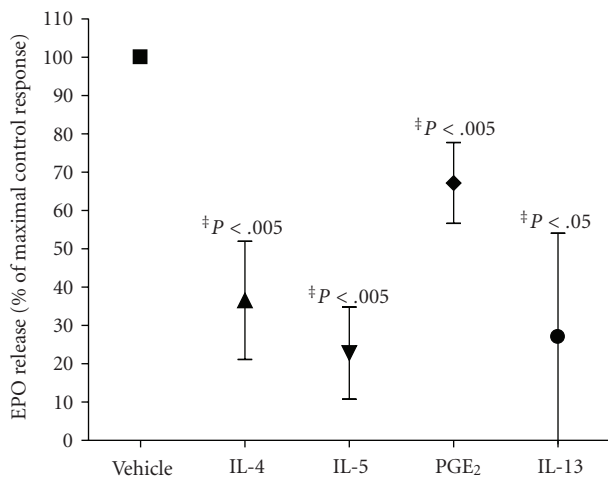


FIGURE 6: Th2 cytokines and PGE₂ inhibit eosinophil degranulation. Purified human eosinophils were pretreated with vehicle, IL-4 (10 ng/mL), IL-5 (10 ng/mL), IL-13 (10 ng/mL), and PGE₂ (10⁻⁶ M) for 1 or 2 hours and then stimulated with C5a (300 nM) for 30 min at 37°C. The release of EPO activity into supernatants was determined by photometry. Data were expressed as a percentage of the maximal control response (300 nM) and are shown as the mean \pm SD; $n = 5-9$; $\dagger P < .005$, $\dagger P < .05$ versus C5a alone (vehicle).

be since both phenomena are occurring simultaneously after IL-4 stimulation. The increase of SOCS3 expression in response to Th2 cytokines in healthy individuals is markedly greater than in those from asthmatic and NAEB patients, indicating that eosinophils from individuals with asthma and NAEB had impaired upregulation of SOCS3 after Th2 stimulation. These results may be explained because, in these patients, Th2 cytokines are present in the microenvironment

conferring an intrinsic Th2 status that could provide a negative feedback mechanism, so further stimulation hardly causes additional effect in SOCS3 mRNA expression. Similar findings have been published [31, 32].

It was also interesting to evaluate the potential role of IFN- γ in regulating SOCS3 expression in purified eosinophils due to its ability to counteract the effects of Th2 cytokines in various cell types, including T cells, B cells, endothelium, and epithelium [33]. Nevertheless, our results did not reveal any variation in the SOCS3 mRNA expression, suggesting that SOCS3 is not regulated by this mediator.

We also analyzed the expression of SOCS3 and SOCS5 in peripheral blood CD4 T cells from patients with NAEB and asthmatics compared with healthy controls. The results showed that the expression of SOCS3 in patients was significantly higher than in control subjects, and we found a correlation between level of SOCS3 mRNA in CD4+ cells and IgE level ($r = 0.58$, $P < .04$). Similarly, Seki et al. [32] reported that the level of SOCS3 mRNA in peripheral CD3+ cells was elevated and correlated with the serum IgE level in patients with atopic dermatitis and asthma. Analysis of the levels of SOCS5 gene expression indicated that there was no significant change between the groups. These results are in concordance with other studies in which there were no differences in SOCS5 gene expression level between healthy subjects and those with asthma or atopic dermatitis [34, 35].

SOCS3 has the potential to modify responsiveness of airways to important cytokines. SOCS3 is expressed in eosinophils, and although cytokines themselves are likely to contribute to this, we have shown that PGE₂, which is produced in airways, can also stimulate SOCS3 expression in eosinophils. Several studies have reported that PGE₂ treatment not only stimulates the expression of SOCS3 in different cells, but also prolongs the stability of SOCS3 mRNA [19–21, 36]. Recently, we have described increased PGE₂ levels in the airways of patients with NAEB [16], so

it is not surprising that individuals with NAEB who have high PGE₂ levels also have high levels of expression of SOCS3 ($r = 0.81$, $P < .05$). When we analyzed the effect of PGE₂ in SOCS3 expression in blood eosinophils *in vitro*, we observed a significant increase in SOCS3 mRNA expression in a time- and dose-dependent manner.

The differential regulation of SOCS3 expression by distinct stimuli creates a situation whereby potentiation of SOCS3 expression is possible. In our study, we observed that IL-4, IL-5, and IL-13, at doses to produce maximal SOCS3 expression, inhibited eosinophil degranulation, probably through SOCS3 augmentation. According with these results, Hebenstreit et al. show that SOCS1 and SOCS3 can negatively regulate IL-4- and IL-13-induced CCL26 expression [37], which is one of the main attractants of eosinophils. Both results highlight an important mechanism SOCS3 mediated for regulating the activation and recruitment of eosinophils during inflammation by limiting the effects of Th2 cytokines.

Also, in our study eosinophils degranulation is partially inhibited by PGE₂. Perhaps, in addition to other effects, PGE₂-induced SOCS3 expression may be important in regulating responsiveness to cytokines and could be involved in the pathogenesis and regulation of Th2 respiratory disorders. Recently, Sturm et al. point out that prostaglandin E2 inhibits eosinophil trafficking through EP2 receptors [38]. This data provide a novel mechanistic concept to substantiate previous observations that PGE₂ acts as an anti-inflammatory mediator in human airways [15–18].

The diverse and specific effects of PGE₂ depend on different EP receptor subtypes. In eosinophils, all forms of EP receptor genes are expressed [39]; in our patients, EP₂ and EP₄ were expressed at a higher level when compared with EP₁ and EP₃ (data not shown), so these results suggest that PGE₂-induced modulation of cytokines signaling can occur via EP₂ and/or EP₄ receptors, although further studies are necessary to confirm this notion.

5. Conclusions

The most important finding in the current study was that expression of SOCS3 protein has been described for the first time in eosinophils, and as SOCS3 has an important role in regulating the onset and maintenance of Th2-mediated allergic immune diseases, this could contribute to improve the understanding of the pathways implicated in the regulation of these diseases. It is also a novel finding that PGE₂, which is highly produced in some Th2 diseases, can modulate effects on the immune response via regulation of cytokine signaling.

A precise regulation of both, the magnitude and duration of cytokine signaling, is essential for orchestration of immune reactions. Interventions that regulate Th2 cytokine effector pathways are attractive as potential therapeutic targets. The implication of SOCS proteins in the regulation of the Th1/Th2 balance suggests a range of new therapeutic strategies that might reduce Th2-induced inflammation and its consequences in eosinophilia.

Acknowledgments

This study was funded by Grants PI06/055 and PS09/00153 from the Health Research Fund (*Fondo de Investigación Sanitaria—FIS*) and *CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES)*, a Carlos III Institute of Health initiative, and by fellowship grants from the Conchita Rábago Foundation (C. Gámes, M. P. Zafra).

References

- [1] P. G. Gibson, J. Dolovich, J. Denburg, E. H. Ramsdale, and F. E. Hargreave, "Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma," *Lancet*, vol. 1, no. 8651, pp. 1346–1348, 1989.
- [2] C. E. Brightling, R. Ward, K. L. Goh, A. J. Wardlaw, and I. D. Pavord, "Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 160, no. 2, pp. 406–410, 1999.
- [3] C. E. Brightling, F. A. Symon, S. S. Birring, P. Bradding, I. D. Pavord, and A. J. Wardlaw, "TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 110, no. 6, pp. 899–905, 2002.
- [4] C. E. Brightling, F. A. Symon, S. S. Birring, P. Bradding, A. J. Wardlaw, and I. D. Pavord, "Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma," *Thorax*, vol. 58, no. 6, pp. 528–532, 2003.
- [5] W. S. Alexander and D. J. Hilton, "The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response," *Annual Review of Immunology*, vol. 22, pp. 503–529, 2004.
- [6] N. A. Barrett and K. F. Austen, "Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation," *Immunity*, vol. 31, no. 3, pp. 425–437, 2009.
- [7] J. Elliott and J. A. Johnston, "SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis," *Trends in Immunology*, vol. 25, no. 8, pp. 434–440, 2004.
- [8] M. Kubo, T. Hanada, and A. Yoshimura, "Suppressors of cytokine signaling and immunity," *Nature Immunology*, vol. 4, no. 12, pp. 1169–1176, 2003.
- [9] M. Fujimoto and T. Naka, "Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules," *Trends in Immunology*, vol. 24, no. 12, pp. 659–666, 2003.
- [10] C. R. Yu, R. M. Mahdi, S. Ebong, B. P. Vistica, I. Gery, and C. E. Egwuagu, "Suppressor of cytokine signaling 3 regulates proliferation and activation of T-helper cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 32, pp. 29752–29759, 2003.
- [11] A. Banerjee, A. S. Banks, M. C. Nawijn, X. P. Chen, and P. B. Rothman, "Cutting edge: suppressor of cytokine signaling 3 inhibits activation of NFATp," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 9, pp. 4277–4281, 2002.
- [12] A. Matsumoto, Y. I. Seki, R. Watanabe et al., "A role of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3/CIS3/SSI3) in CD28-mediated interleukin 2 production," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 197, no. 4, pp. 425–436, 2003.
- [13] A. Yoshimura, T. Naka, and M. Kubo, "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 6, pp. 454–465, 2007.
- [14] L. Churchill, F. H. Chilton, J. H. Resau, R. Bascom, W. C. Hubbard, and D. Proud, "Cyclo-oxygenase metabolism of endogenous arachidonic acid by cultured human tracheal epithelial cells," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 140, no. 2, pp. 449–459, 1989.

- [15] F. Delamere, E. Holland, S. Patel, J. Bennett, I. Pavord, and A. Knox, "Production of PGE₂ by bovine cultured airway smooth muscle cells and its inhibition by cyclo-oxygenase inhibitors," *British Journal of Pharmacology*, vol. 111, no. 4, pp. 983–988, 1994.
- [16] E. Melillo, K. L. Woolley, P. J. Manning, R. M. Watson, and P. M. O'Byrne, "Effect of inhaled PGE₂ on exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 149, no. 5, pp. 1138–1141, 1994.
- [17] I. D. Pavord, C. S. Wong, J. Williams, and A. E. Tattersfield, "Effect of inhaled prostaglandin E₂ on allergen-induced asthma," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 148, no. 1, pp. 87–90, 1993.
- [18] P. J. Manning, C. G. Lane, and P. M. O'Byrne, "The effect of oral prostaglandin E₁ on airway responsiveness in asthmatic subjects," *Pulmonary Pharmacology*, vol. 2, no. 3, pp. 121–124, 1989.
- [19] J. D. Curlew, S. P. Tam, P. Lau et al., "A prostaglandin F_{2α} analog induces suppressors of cytokine signalling-3 expression in the corpus luteum of the pregnant rat: a potential new mechanism in luteolysis," *Endocrinology*, vol. 143, no. 10, pp. 3984–3993, 2002.
- [20] H. Cheon, Y. H. Rho, S. J. Choi et al., "Prostaglandin E₂ augments IL-10 signaling and function," *Journal of Immunology*, vol. 177, no. 2, pp. 1092–1100, 2006.
- [21] A. K. Boer, A. L. Drayer, H. Rui, and E. Vellenga, "Prostaglandin-E₂ enhances EPO-mediated STAT5 transcriptional activity by serine phosphorylation of CREB," *Blood*, vol. 100, no. 2, pp. 467–473, 2002.
- [22] B. Sastre, M. Fernández-Nieto, R. Mollá et al., "Increased prostaglandin E₂ levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis," *Allergy*, vol. 63, no. 1, pp. 58–66, 2008.
- [23] American Thoracic Society, "Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma," *American Review of Respiratory Research*, vol. 136, no. 1, pp. 225–244, 1987.
- [24] *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, NIH Publication no. 02-3659, GINA, 2002, Update from NHLB/WHO Workshop Report 1995.
- [25] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.
- [26] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [27] R. Menegazzi, G. Zabucchi, A. Knowles, R. Cramer, and P. Patriarca, "A new, one-step assay on whole cell suspension for peroxidase secretion by human neutrophils and eosinophils," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 52, no. 6, pp. 619–624, 1992.
- [28] Y. I. Seki, K. Hayashi, A. Matsumoto et al., "Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 20, pp. 13003–13008, 2002.
- [29] C. E. Ekwuagu, C. R. Yu, M. Zhang, R. M. Mahdi, S. J. Kim, and I. Gery, "Suppression of cytokine signaling proteins are differentially expressed in TH1 and TH2 cells: implications for TH cell lineage commitment and maintenance," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 7, pp. 3181–3187, 2002.
- [30] H. Qin, K. L. Roberts, S. A. Niyongere, Y. Cong, C. O. Elson, and E. N. Benveniste, "Molecular mechanism of lipopolysaccharide-induced SOCS-3 gene expression in macrophages and microglia," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 9, pp. 5966–5976, 2007.
- [31] S. Fukuyama, T. Nakano, T. Matsumoto et al., "Pulmonary suppressor of cytokine signaling-1 induced by IL-13 regulates allergic asthma phenotype," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 179, no. 11, pp. 992–998, 2009.
- [32] Y. I. Seki, H. Inoue, N. Nagata et al., "SOCS-3 regulates onset and maintenance of Th2 mediated allergic responses," *Nature Medicine*, vol. 9, no. 8, pp. 1047–1054, 2003.
- [33] N. M. Heller, S. Matsukura, S. N. Georas et al., "Interferon-γ inhibits STAT6 signal transduction and gene expression in human airway epithelial cells," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 31, no. 5, pp. 573–582, 2004.
- [34] S. Arakawa, Y. Hatano, and K. Katagiri, "Differential expression of mRNA for Th1 and Th2 cytokine-associated transcription factors as suppressors of cytokine signaling in peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 135, no. 3, pp. 505–510, 2004.
- [35] M. Kubo and H. Inoue, "Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in Th2 cells evokes Th2 cytokines, IgE and eosinophilia," *Current Allergy and Asthma Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 32–39, 2006.
- [36] J. L. Barclay, S. T. Anderson, M. J. Waters, and J. D. Curlew, "Characterization of the SOCS3 Promoter Response to Prostaglandin E₂ in T47D Cells," *Molecular Endocrinology*, vol. 21, no. 10, pp. 2516–2528, 2007.
- [37] D. Hebenstreit, P. Luft, A. Schmiedlechner, A. Duschl, and J. Horejs-Hoeck, "SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IL-4 and IL-13 induced activation of Eotaxin-3/CCL26 gene expression in HEK293 cells," *Molecular Immunology*, vol. 42, no. 3, pp. 295–303, 2005.
- [38] E. M. Sturm, P. Schratl, R. Schuligoi et al., "Prostaglandin E₂ inhibits eosinophil trafficking through E-prostanoid 2 receptors," *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 10, pp. 7273–7283, 2008.
- [39] S. Ying, B. J. O'Connor, Q. Meng et al., "Expression of prostaglandin E₂ receptor subtypes on cells in sputum from patients with asthma and controls: effect of allergen inhalation challenge," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 114, no. 6, pp. 1309–1316, 2004.

Misregulation of suppressors of cytokine signaling in eosinophilic esophagitis

M^a Paz Zafra · Natally Cancelliere · Pablo Rodríguez del Río · Mónica Ruiz-García ·
Laura Estévez · Victoria Andregnette · Silvia Sánchez-García · Ana Fiandor · Elena Collantes ·
Joaquín Sastre · Santiago Quirce · María Dolores Ibáñez · Victoria del Pozo

Received: 11 July 2012 / Accepted: 11 November 2012
© Springer Japan 2012

Abstract

Background Several findings suggest that eosinophilic esophagitis (EoE) is strongly associated with atopy and allergen-driven, Th2-type immune responses, indicating the association of EoE with immune dysregulation. The objective of this study is to ascertain the molecular mechanism involved in EoE disease development a Th2 condition.

Methods 25 patients with diagnosis of EoE and 17 non-EoE controls were recruited by the gastroenterology and allergy departments from three different hospitals. Transcription analysis of suppressors of cytokine signaling 1, 3, 5 (SOCS), interleukin-5 (IL), IL-13, eotaxin (CCL26),

eotaxin receptor (CCR3), and mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1) was performed in esophageal biopsies by real time PCR. Western blot of ERK esophageal protein and additional measures of IL-5 and VEGF levels in serum were performed.

Results The esophagus of EoE patients expresses and synthesizes high levels of SOCS1 and SOCS3 proteins ($P < 0.05$), and these expression correlated with levels of IL-5, IL-13, CCL26, CCR3, and MAPK1 genes. In addition, we demonstrate the implication of the ERK pathway ($P < 0.001$).

Conclusions SOCS proteins probably contribute to EoE pathogenesis by directly or indirectly inducing the Th2 profile, as well as by promoting the production of Th2 cytokines. All these findings further enhance our understanding of the mechanism of EoE, and accumulating evidence suggests that EoE pathogenesis is likely to be due to misregulation of immunological pathways.

M. P. Zafra · L. Estévez · V. del Pozo (✉)
Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz-Capio,
Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain
e-mail: vpozo@fjd.es

M. P. Zafra · J. Sastre · S. Quirce · V. del Pozo
CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES),
Madrid, Spain

N. Cancelliere · A. Fiandor · S. Quirce
Department of Allergy, Hospital La Paz Health Research
Institute (IdiPAZ), Madrid, Spain

P. Rodríguez del Río · S. Sánchez-García · M. D. Ibáñez
Department of Allergy, Hospital Infantil Universitario del Niño
Jesus, Madrid, Spain

M. Ruiz-García · V. Andregnette · J. Sastre
Department of Allergy, Fundación Jiménez Díaz-Capio,
Madrid, Spain

E. Collantes
Department of Pathology,
Hospital La Paz Health Research Institute (IdiPAZ),
Madrid, Spain

Keywords SOCS1 · SOCS3 · Eosinophilic esophagitis

Introduction

Eosinophilic esophagitis (EoE) is a disease of increasing recognition and prevalence in both pediatric and adult populations [1–3]. EoE is characterized by the accumulation of eosinophils in the esophageal mucosa [4]. Recently, a consensus definition has been accepted and published [5] which states that EoE represents a chronic, immune/antigen-mediated esophageal disease characterized clinically by symptoms related to esophageal dysfunction and histologically by eosinophil-predominant inflammation. Histologically, diagnosis requires an eosinophil peak esophageal count that is greater than 15 eosinophils per high-power field

(hpf) in the upper, middle, and lower esophagus. Clinical symptoms including dysphagia, vomiting, and abdominal pain are common.

Several findings suggest that EoE is strongly associated with atopy and allergen-driven, Th2-type immune responses [6–8], although cases of patients with EoE but with no detectable sensitization to food or inhalant allergens have been described, thus indicating the association of EoE with immune dysregulation.

Eosinophilic esophagitis has a complex pathogenesis in which multiple etiologic factors interact. Environmental factors and genetic background certainly play a role in the onset, persistence, and pathogenesis of EoE. Like most Th2 diseases, EoE is a disorder with multiple factors that strongly contribute to disease expression. Inflammatory mediators and cytokines play an essential role in controlling immune systems; not only do they act as growth factors, but they also regulate the differentiation, maintenance, and activation of naïve effectors and the memory state of immune cells [9]. The Th1/Th2 balance determines the nature of the immune response [10]; however, the mechanism by which Th1 and Th2 cytokines cross-regulate the immune response remains unclear.

In both physiological and pathological conditions, cytokine function is strictly controlled to prevent inappropriately sustained activation of downstream responses. Cytokine signaling pathways are negatively regulated by the so-called suppressor of cytokine signaling (SOCS) family of proteins, in which there are eight members [11]. Several reports have indicated that SOCS proteins are necessary for regulation of normal immune responses [12]. SOCS proteins not only act as simple negative-feedback regulators, but are also involved in fine-tuning the immune response and in the crosstalk of complicated cytokine signal networks. Since cytokines are constantly present in the microenvironment of immune cells, signal regulation by SOCS-family proteins may be important for the proper progress, remission, and relapse of an immune response. Therefore, SOCS1, SOCS3, and SOCS5 participate in CD4⁺ Th-cell differentiation and in Th1/Th2-cell balance [13]. SOCS3 is predominantly expressed in Th2 cells and inhibits Th1 differentiation [14–16]. Conversely, SOCS5 is predominantly expressed in Th1 cells and inhibits Th2 differentiation [12, 17]. The fact that these SOCS proteins (SOCS1, 3 and 5) are involved in the regulation of Th1/Th2 balance suggests the SOCS implication in EoE pathogenesis, for these reasons, we studied SOCS expression in EoE and Th2-relating cytokines.

Thus, although several advances have been made in the understanding of EoE pathogenesis, the objective of this study is to ascertain the molecular mechanism involved in EoE disease development as a Th2 condition.

Methods

Subjects

Patients with a previous diagnosis of EoE as defined consensus guidelines [1] were proposed for inclusion to this prospective study with a cross-sectional design. Recruitment was performed in Madrid in the allergy departments of Fundación Jiménez Díaz, Hospital Niño Jesús, and Hospital La Paz from January, 2009 to May, 2011. All individuals were selected regardless of age, atopic status, or gender. EoE diagnosis was performed using established criteria based on clinical and histopathologic features [1]: clinical symptoms of esophageal dysfunction; >15 eosinophils/hpf; and GERD was excluded. Initially, forty-one subjects fulfilled the inclusion criteria and went through all study tests. Sixteen patients were excluded for the following reasons: 10 patients with prior EoE diagnosis were determined to have fewer than 5 eosinophils/hpf according to current esophageal biopsies; in esophageal samples from 3 patients, not enough RNA could be extracted for analysis; one patient reported having received active treatment with oral corticosteroids in the 2 weeks before the endoscopy was performed; two patient voluntarily abandoned the study. A final number of 25 EoE patients were included for analysis.

Most of the non-EoE controls were recruited by the Gastroenterology Department based on the following criteria: complaints of abdominal pain along with other clinical features compatible with gastro-esophageal reflux disease (GERD); no prior diagnosis of EoE; and esophageal biopsies showing an eosinophil count below 5 with no basal layer expansion. A final number of 17 control subjects were included for analysis.

All study procedures were approved by the Ethics Committee, and informed written consent was provided by all subjects recruited. The study was conducted according to the principles set forth in the Declaration of Helsinki.

Skin prick tests

Skin prick tests (SPT) were performed following the recommendations of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology [18] using a large spectrum of common aeroallergens within our region. All subjects ($n = 42$) underwent SPT to aeroallergens (ALK-Abello, Madrid, Spain) with house dust mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*), molds (*Aspergillus* spp, *Alternaria alternata*), animal danders (cat and dog), tree pollens (*Cupressus sempervirens*, *Olea europaea*, *Platanus acerifolia*), grass pollens (*Phleum pratense*) and weed pollens (*Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*, and *Salsola kali*). The following food allergens were also

tested: wheat, rice, maize, oat, egg white, cow's milk casein, peach, apple, melon, chicken, beef, shrimp, lentil, chickpea, pea, soy, squid, megrim, hake, tuna, swordfish, peanut, walnut, garlic, potato, and *Anisakis simplex*.

Skin prick tests were performed on the volar face of the forearm using a standard 1-mm-tip lancet (ALK-Abello, Madrid, Spain). Histamine hydrochloride (10 mg/ml) and saline were used as positive and negative controls, respectively. Readings were taken after 15 min, and reactions were expressed as the mean of the major and minor wheal diameters. A wheal diameter of 3 mm or more compared to saline control was considered positive [19].

Total IgE and serum specific IgE

Blood samples, which were collected on the same day the endoscopy was performed or over the following 7 days, were centrifuged at 4000 rpm for 15 min to obtain serum. Total and specific IgE to the same panel of aeroallergens and foods tested in SPT were determined in serum, using the ImmunoCAP immunoassay system and the ISAC platform (Phadia, Uppsala, Sweden).

PBMC and eosinophil purification

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and eosinophils obtained from patients' and controls' blood were purified using a two-step procedure. First, the polymorphonuclear and mononuclear cell fractions were obtained by density gradient centrifugation using Lymphoprep (Rafer, Spain), followed by lysis of the red cells with an ammonium chloride solution (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , and 0.1 mM EDTA). The second step involved removal of residual cells from the polymorphonuclear cell fraction. For eosinophil purification, CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD123, and glycophorin A positive cells were discarded by a magnetic bead separation technique, as described in the manufacturer's procedure (EasySep[®]; StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Eosinophils are defined as $\text{CCR3}^+\text{CD16}^-$ cells, so we stained the cells with fluorochrome-conjugated anti-CCR3 (CCR3-FITC) and anti-CD16 (CD16-PE) antibodies. The purity obtained was routinely >98 % as measured by flow cytometry. 1×10^6 eosinophils were lysed in Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). PBMCs were obtained from the mononuclear fraction and were washed twice with saline solution and stained with trypan blue to check for viability.

Endoscopies and esophageal biopsies

Before endoscopy, the patients were required to have a minimum wash-out period of 2 weeks during which they

abstained from inhaled and swallowed corticosteroids. All patients underwent endoscopies and a minimum of two biopsies of the upper, medium and from the lower esophageal mucosa. A sample from each site was stained with hematoxylin/eosin and evaluated in each participating center for eosinophil count and histologic analysis. A peak number of intraepithelial eosinophils >15 EoE per high-power field (0.158 mm^2) ($\times 400$) in the upper, middle, and lower esophagus was considered an EoE diagnosis criterion if accompanied by endoscopic findings and/or clinical manifestations suggestive of EoE. The second biopsy from the upper, medium and lower site was immersed in Trizol[®] reagent and kept frozen at -80°C for further analyses.

Reverse transcription PCR

Total RNA was isolated from peripheral blood eosinophils, lymphocytes, and esophageal biopsies by Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and was treated with DNase I (Promega, Wisconsin, USA). Esophageal biopsies were homogenized previously. RNA was measured by spectrophotometry, and 1 μg of RNA was reverse-transcribed to cDNA using a high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK).

Gene expression on cells and esophageal biopsies

Real-time quantitative PCR of peripheral blood eosinophils, lymphocytes, and biopsies was conducted for several genes.

Quantitative real-time PCR was performed on a 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Warrington, UK). Taqman PCR was performed using a 20 μl final reaction volume containing 10 μl of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA), 1 μl of 20X Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix, and 9 μl of cDNA diluted in RNase-free water. Each assay was performed in triplicate. The PCR conditions used in all reactions were: 2 min at 50°C and 10 min at 95°C , repeated over 40 two-step cycles (95°C for 15 s and 60°C for 60 s). Assays-on-Demand Gene Expression primers specific for SOCS1, SOCS3, SOCS5, IL-5, IL-13, CCL26, CCR3, MAPK1, and rRNA 18S (used as an endogen) were obtained from Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com/>).

Messenger RNA was calculated for each sample using the cycle threshold (C_t) value. The number of amplification steps required to reach an arbitrary intensity C_t was computed. The relative gene expression was calculated as follows: $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{\text{target gene}} - \Delta C_{18s}$. The fold-change for the treatment was defined as the relative expression compared with the corresponding control, and was calculated as follows: $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{\text{patient}} - \Delta C_{\text{healthy}}$ [20].

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded sections of proximal esophageal biopsies were studied by immunohistochemistry. Briefly, after antigen retrieval and blockade of endogenous peroxidase, proximal esophageal biopsies sections were incubated with primary antibodies overnight at 4 °C, rabbit anti-SOCS3, anti-SOCS1, anti-pERK antibody (Santa Cruz Biotech, CA, USA) or mouse anti-IL-13 (eBiosciences, CA, USA). Antibody binding was detected with a rabbit EnVision HRP System (Dako, Golstrup, Denmark) or an anti-mouse HRP (eBioscience), and the distribution of the peroxidase was visualized with diaminobenzidine. Sections were counterstained with Carazzi's hematoxylin, dehydrated, and mounted. The specificity was checked by omission of primary antibodies and use of non-immune sera. The esophageal section for each patient was evaluated in a blinded manner by 2 investigators who assessed the localization of SOCS protein.

Western blot analysis

Protein extracts from esophageal biopsies (10 µg total protein) were resolved on SDS-PAGE and analyzed by western blotting using a 1:500 dilution of phospho-ERK antibody (BioLegend, San Diego, CA, USA). The secondary antibody, HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Millipore, Billerica, MA, USA), was diluted 1:10000. Membranes were also probed with anti-ERK (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) as control of protein loading.

Chemiluminescent protein bands were detected by an ECL detection system (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's protocol. The protein concentration was estimated according to the Bradford method [21].

Cytokine measurement

The human cytokine array panel A was used, employing serum pools from EoE patients and control groups according to the manufacturer's protocol (R&D Systems). These are the selected captured antibodies spotted in duplicate on the nitrocellulose membrane: C5a, CD40 ligand, G-CSF, GM-CSF, CXCL1, CCL1, CD54, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-16, IL-17, IL-17E, IL-23, IL-27, IL-32 α , CXCL10, CXCL11, CCL2, MIF, CCL3, CCL4, Serpin E1, RANTES, CXCL12, and TNF- α .

Moreover, serum IL-5 concentrations from EoE and control subjects were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) purchased from Bender MedSystems, Austria, following the manufacturer's procedure. Fifty microliters of each serum sample was used,

and the assay was performed in duplicate. The optical density was read at 450 nm and wavelength correction was set to 620 nm using a microplate reader (TECAM).

The normalization of protein levels in serum was performed using total albumin measuring.

Statistics

The subject characteristics were described using descriptive statistics and expressed as geometric mean, standard deviation (SD), median, and range.

Data comparisons between the groups were performed using the Mann–Whitney test (two tailed) and Fisher's exact test (two sided). Normality was analyzed with the Kolmogorov–Smirnov test. Correlation coefficients and statistical significance were determined using Spearman rank correlation coefficient. Statistical significance was recognized at $P \leq 0.05$. Statistical analyses were performed using GraphPad InStat3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Patients' baseline characteristics

Forty-two subjects were included for analysis, including 25 diagnosed with EoE and 17 controls. Median age at inclusion was 28.9 (range 22–35) and 38.6 (range 30–47) years in EoE and non-EoE patients, respectively, with no significant differences ($P > 0.05$). Five EoE patients and 1 control were 14 years of age or younger. There were no differences in gender distribution between the groups, although there was a higher number of males in both groups (88 % among EoE patients and 59 % in non-EoE subjects). All subjects were Caucasian.

When personal history of atopy (defined by one or more sensitizations) was compared in the study subjects, 20 out of 25 (80 %) EoE patients displayed at least one sensitization to an aeroallergen compared to 4/17 (23.5 %) in non-EoE subjects ($P < 0.001$). Twenty (80 %) EoE patients had allergic rhinoconjunctivitis compared to 5 (29.41 %) in controls ($P < 0.005$); and 11 (44 %) had IgE-mediated food allergy versus 3 (18 %) in controls ($P > 0.05$). A summary of epidemiologic and clinical features of all the patients studied is shown in Table 1.

Eosinophil peripheral blood count, SPT and sIgE

Differences in peripheral blood eosinophil count (cell/mm³) were observed between EoE and non-EoE subjects (502.2 ± 331 vs. 286.4 ± 188.4 , $P < 0.05$; Table 1). Total IgE (kU_A/L) in patients with EoE was higher than in those

Table 1 Epidemiologic, clinical, and endoscopic features of subjects studied

| | Controls subjects (non EoE) (n = 17) | Eosinophilic esophagitis patients (EoE) (n = 25) | P value ^{1,2} |
|---|--------------------------------------|--|------------------------|
| Age (mean, range) | 38.69 (13–68) | 28.9 (9–49) | NS |
| Male (%) | 58.8 % | 88 % | NS |
| Allergic rhinoconjunctivitis (%) | 29.41 % | 80 % | <0.005 ² |
| Food allergy (%) | 18 % | 44 % | NS |
| Total serum IgE, kU/L (mean ± SD) | 271 ± 538 | 713 ± 1127 | <0.005 ² |
| Positive specific IgE to food (%) | 17.64 % | 84 % | <0.001 ² |
| Positive specific IgE to pollen (%) | 23.52 % | 80 % | <0.001 ² |
| Peripheral blood eosinophilia (mean ± SD) | 286.42 ± 188 | 502.2 ± 331 | <0.05 ¹ |
| Endoscopy description (n, %) | | | |
| Rings and strictures | 1 (5.9) | 15 (60) | <0.001 ² |
| Longitudinal furrows | 0 (0) | 7 (28) | <0.05 ² |
| Trachealization | 1 (5.9) | 8 (32) | NS |
| Lacerations | 0 (0) | 2 (8) | NS |
| Whitish exudates | 1 (5.9) | 5 (20) | <0.005 ² |
| Hiatal hernia | 2 (11.8) | 1 (4) | NS |
| Normal | 11 (64.7) | 3 (12) | <0.001 ² |
| Peak eosinophil count in biopsy (mean, range) | <5 eos/hpf | 35.8 (24–100) | <0.001 ¹ |

NS not significant

¹ Two tailed P (Mann–Whitney test)² Two-sided P value (Fisher's exact test)**Table 2** Sensitization profile: skin prick tests and serum specific IgE

| | Control subjects (non-EoE) (n = 17) | Eosinophilic esophagitis patients (EoE) (n = 25) | P value ¹ |
|------------------------|-------------------------------------|--|----------------------|
| Pollen SPT (%) | 4 (24 %) | 20 (80 %) | <0.001 |
| Animal danders SPT (%) | 2 (12 %) | 16 (64 %) | <0.005 |
| Molds SPT (%) | 0 (0 %) | 7 (28 %) | <0.05 |
| Dust mites SPT (%) | 1 (6 %) | 5 (20 %) | NS |
| sIgE to fish (%) | 0 (0 %) | 4 (16 %) | NS |
| sIgE to cereals (%) | 0 (0 %) | 16 (64 %) | <0.001 |
| sIgE to potato (%) | 1 (6 %) | 13 (52 %) | <0.005 |
| sIgE to legumes (%) | 0 (0 %) | 13 (52 %) | <0.001 |
| sIgE to chicken (%) | 0 (0 %) | 6 (24 %) | NS |
| sIgE to egg yolk (%) | 0 (0 %) | 6 (24 %) | NS |
| sIgE to garlic (%) | 1 (6 %) | 13 (52 %) | <0.005 |

NS not significant

¹ Two-sided P value (Fisher's exact test)

without EoE (712 ± 1125 , and 271 ± 538.9 , $P < 0.005$; Table 1).

Most patients with EoE were sensitized to pollens (80 %, $P < 0.001$) and animal dander (64 %, $P < 0.005$) as well as food allergens. Table 2 describes in detail different sensitization profiles.

Endoscopy

Detailed macroscopic changes in endoscopy are described in Table 1. Rings, strictures ($P < 0.001$), whitish exudates ($P < 0.005$), and longitudinal furrows ($P < 0.05$) were the most important changes in EoE patients compared to

controls, whereas the finding of a normal esophagus was found more frequently in non-EoE patients ($P < 0.001$). Although the pediatric EoE population was too small for a consistent statistical analysis, it is noteworthy that trachealization was found in 80 % of the children compared to 20 % of the EoE adults; also notable are the whitish exudates found in 60 % of children and 10 % of adults and the finding of longitudinal furrows in 60 % of children vs. 20 % of adults. None of the pediatric patients showed rings or strictures.

Biopsies of the upper, middle, and lower esophagus showed that all EoE patients had an eosinophil count that was greater than 15/hpf, while none of the controls showed

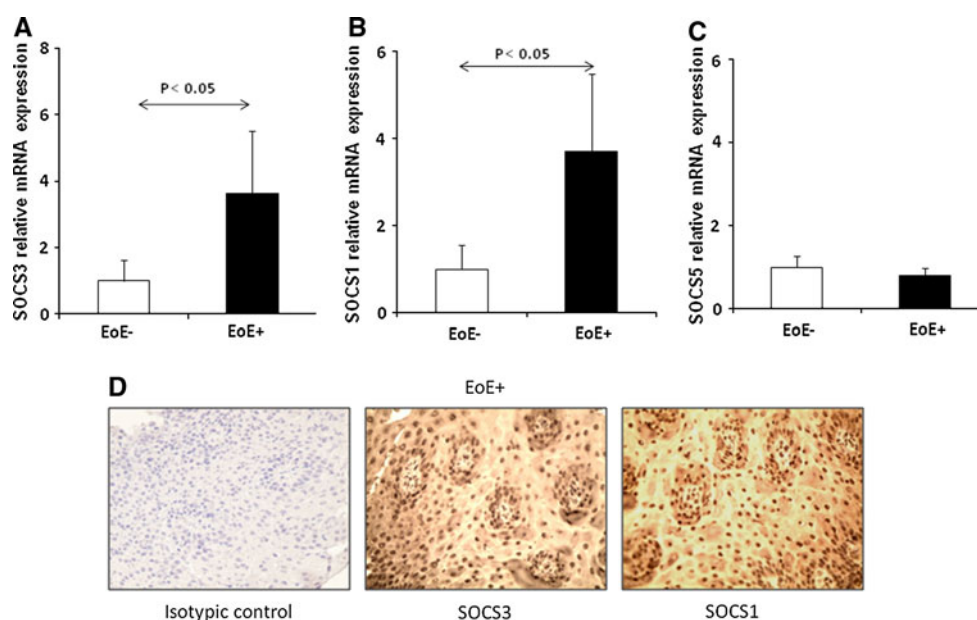


Fig. 1 SOCS 1, 3, and 5 gene expressions in proximal esophageal biopsies from EoE patients and control subjects. Relative SOCSs mRNA levels from EoE patients and control subjects were determined by real-time quantitative PCR. *White bars* represent the control group (mean \pm SD, $n = 17$), and *black bars* the EoE group (mean \pm SD, $n = 25$). The results show relative gene expressions as determined by the $\Delta\Delta C_t$ method, and higher differences in SOCS3 (**a**) and SOCS1

(**b**) expression levels were obtained for the EoE group versus the control group, $P < 0.05$. No differences were achieved when SOCS5 gene expression was assessed ($P > 0.05$, **c**). **d** A representative immunohistochemical staining of SOCS1 and SOCS3 in the esophageal biopsies from EoE patients. Negative control (*left side panel*): isotypic antibody was substituted for primary antibody. *Brown colour* indicates positive staining for all primary antibodies ($n = 5$; $\times 400$)

a peak eosinophil count over 15 in any region of the esophagus. A summary of endoscopic features of all the patients studied is shown in Table 1.

SOCS1 and SOCS3 gene expression, but not SOCS5 expression, is up-regulated in proximal esophageal biopsies from EoE patients

We evaluated transcripts for SOCS1, SOCS3, and SOCS5 in proximal, esophageal biopsies from 25 EoE patients and 17 controls. We observed up-regulation of SOCS3 and SOCS1 mRNA levels in biopsies from EoE patients when compared with those of the control group (Fig. 1a, b) ($P < 0.05$). In contrast, esophageal biopsies revealed no difference in the mRNA expression of SOCS5 of EoE patients and control subjects based on the results of real-time qPCR (Fig. 1c).

SOCS expression was also determined in distal and medium esophageal biopsies displaying similar results (data not shown).

To support these findings as well as to locate the expression, we performed SOCS3 and SOCS1 immunohistochemistry in proximal esophageal sections from EoE patients. As displayed in Fig. 1d, positive SOCS3 and SOCS1 stained cells were found in proximal esophageal sections from EoE patients, this positivity was mainly noted in epithelial and inflammatory cells. Numerous positive clusters were observed on esophageal rings.

IL-5 and the CCL26-CCR3 axis are involved in EoE

Our results show an elevation in gene expression in EoE patients relative to controls for all genes tested: IL-5, CCL26, and CCR3 (89.7-fold; 86.5-fold; and 5.9-fold respectively, $P < 0.05$) (Fig. 2), thus corroborating previous findings in proximal biopsies.

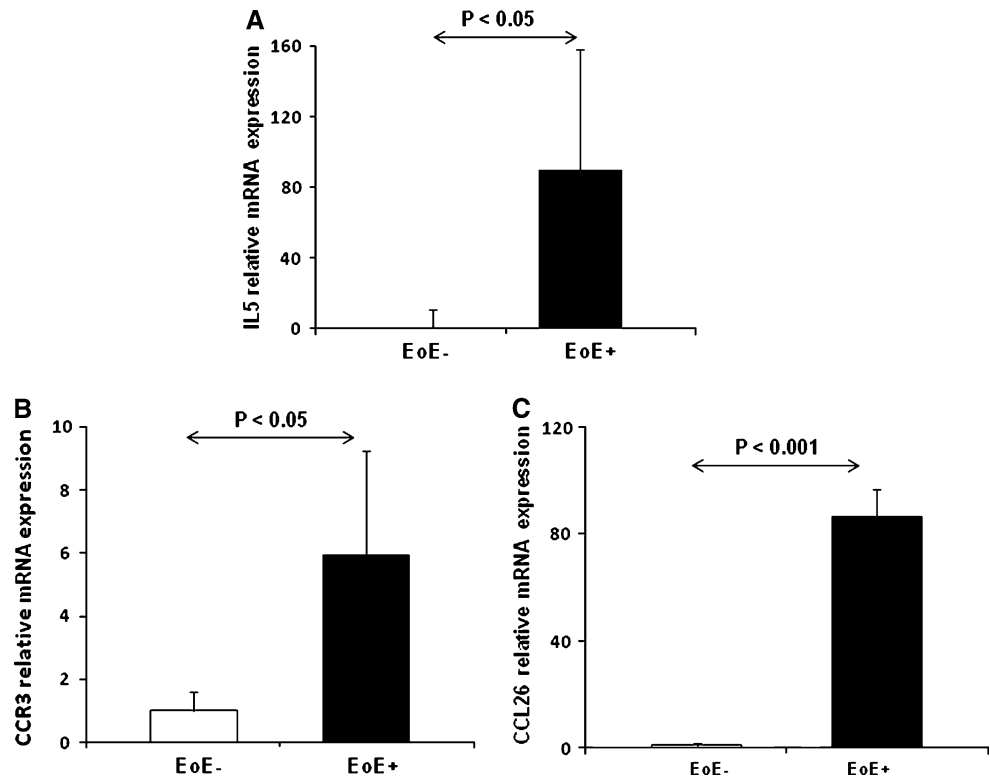
IL-13 detection in proximal esophageal biopsies from EoE patients

We also found an up-regulation of IL-13 mRNA levels (10.5-fold) in proximal esophageal biopsies from EoE patients compared with those of the control group measured by real-time quantitative PCR (Fig. 3a). Additionally, IL-13 immunostaining was performed in proximal esophageal biopsies from EoE patients to locate this interleukin. Positive IL-13 cells were observed at the inflammatory site and also in epithelial cells (Fig. 3b).

Implication of the ERK pathway in EoE disease

CCL26 acts through the ERK pathway; therefore, we analyzed MAPK 1 mRNA levels by RT-PCR. Accordingly, in proximal esophageal biopsies from EoE patients, ERK gene expression was demonstrated to be stronger than in the biopsies from the control group (Fig. 4a). To ascertain

Fig. 2 Augmented IL5, CCL26, and CCR3 gene expression in proximal esophageal biopsies of EoE patients. Real-time quantitative PCR to IL5 (a), CCR3 (b), and CCL26 (c) were performed from esophageal biopsies. Significant differences in gene expression of IL-5 ($P < 0.05$), CCL26 ($P < 0.001$), and CCR3 ($P < 0.05$) were found between the two groups of study. Data represent mean \pm SD, control group ($n = 17$), and EoE group ($n = 25$)



whether the same effect was observable at the protein expression level, a western blot analysis was performed on the esophageal biopsies. As depicted in Fig. 4b, higher phospho-ERK (p-ERK) protein expression was detected in biopsies from EoE patients (3.3-fold higher, $P < 0.001$, Fig. 4c). The location of p-ERK in the esophageal tissue was performed by immunohistochemistry (Fig. 4d). Positive p-ERK stained cells were observed in the esophagus of EoE patients.

Correlation of SOCS1 and SOCS3 with the genes analyzed

Transcript levels of SOCS1 and SOCS3 correlated with esophageal and peripheral eosinophilia in EoE patients ($r = 0.41$, $P < 0.05$ and $r = 0.46$, $P < 0.005$ respectively; Spearman rank correlation). We were also interested in testing that gene expression levels observed would correlate with each other. Indeed, we found significant Spearman correlations between SOCS1, SOCS3 and the most of genes measured (IL-5, IL-13, CCL26, CCR3, and MAPK1). A summary of correlation analysis of all parameters studied is shown in Table 3.

Cytokine profile and SOCS3 expression displayed no alterations at the systemic level in EoE subjects

Determination of SOCS3 mRNA relative levels in blood PBMCs (Fig. 5a) and eosinophils (Fig. 5b) exhibited no

differences ($P > 0.05$) between EoE and non-EoE patients. Therefore, a cytokine array panel was performed to analyze an extensive pattern of mediators implicated in inflammation. Measurement was carried out in two separate pools of serum samples: patients with EoE and controls. Similar patterns of cytokine expression were observed in the two groups (Fig. 5c). To corroborate these results, we determined IL-5 by ELISA in sera from all study subjects, and again, no differences between controls and EoE patients were evident (Fig. 5d).

Discussion

In this study, we identify a set of genes that exhibited differential expression in the esophagi of EoE patients compared with non-EoE patients. Here, we present a novel finding related to the Th2 condition, a consistent characteristic in a set of adult and children patients with EoE. We describe for the first time that, in patients with EoE, the esophagus expresses and synthesizes high levels of SOCS1 and SOCS3 proteins. In addition, we demonstrate the implication of the ERK pathway, suggesting a potential mechanistic link between SOCS regulation and the Th2 phenotype in patients with EoE. IL-5, IL-13 and the CCL26-CCR3 axis were also upregulated at the mRNA levels in the esophagus.

Regarding population characteristics, we have found a higher ratio of males/females than described in the

Fig. 3 Elevated IL-13 expression in esophageal biopsies from EoE patients. Relative IL-13 mRNA levels were determined by real-time quantitative PCR (**a**). Statistical differences were observed between EoE patients and the control group ($P < 0.05$). Data represent mean \pm SD, control group ($n = 17$), and EoE group ($n = 25$). **b** A representative IL-13 immunohistochemistry from biopsies of EoE patients reveals positive staining as indicates the brown colour (central and right panel, $\times 200$ and $\times 400$ magnification, respectively). Negative control (left side panel): isotypic antibody was substituted for primary antibody, $n = 5$

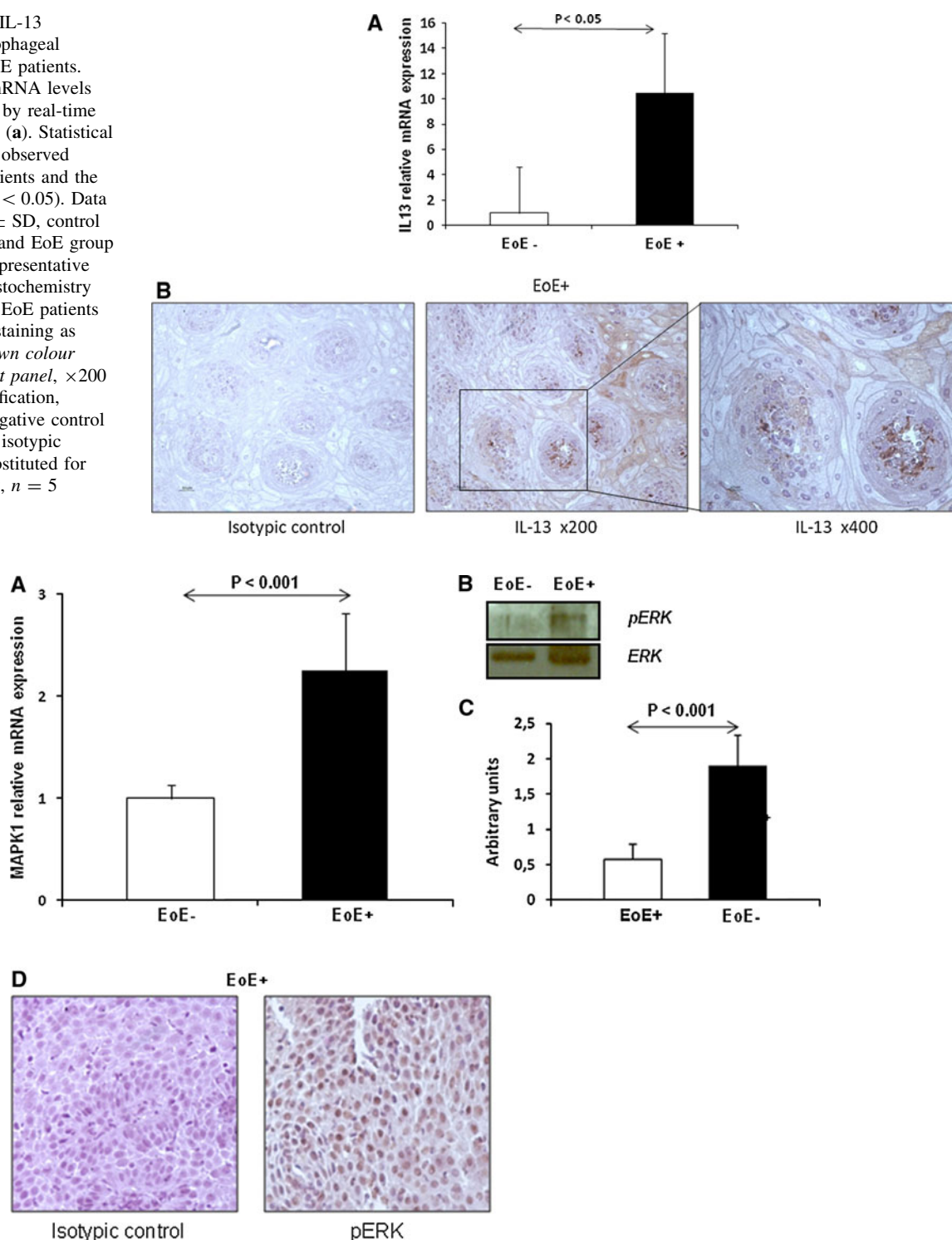


Fig. 4 Implication of ERK pathway in EoE disease. **a** Real-time quantitative PCR was performed from proximal esophageal biopsies to analyze MAPK1 gene expression. White bars represent the control group (mean \pm SD, $n = 17$), and black bars the EoE group (mean \pm SD, $n = 25$, $P < 0.001$). **b** Western blot analysis of the extract of esophagus biopsies was achieved using antibody against ERK and phospho-ERK. Lane 1 biopsy lysate from non EoE patient; lane 2 biopsy lysate from EoE patients. The picture is a representative

example of 5 individuals, all displaying similar results. **c** pERK bands were quantified by densitometry. Data are expressed as the geometric mean \pm SD, $n = 5$, $*P < 0.05$. As a loading control, the total amounts of ERK were determined. **d** p-ERK in esophagus biopsies from EoE patients was detected by immunohistochemistry. An isotypic antibody was tested as control of the technique. Brown colour indicates positive staining for pERK antibody ($n = 5$; $\times 400$)

literature, with almost a 9:1 ratio compared to the 3:1 reported in other studies [22]. As in other studies [23], most of our population was highly atopic, with up to 80 % of our EoE patients suffering from another allergic disease. Supporting the claim of age-dependant evolution in endoscopic findings suggested by Spergel et al. [24], none of the pediatric patients showed esophageal strictures, which are a disease severity marker.

The present study further analyzed SOCS gene expression and its functional role in the EoE and in the mechanistic induction of eosinophils by selective cytokine and chemokines in the esophagus of EoE patients. Using quantitative real-time PCR analysis, we demonstrated that SOCS1 and

SOCS3 mRNA levels were significantly increased in the esophagi of EoE patients but not in peripheral cells such as eosinophils and PBMCs. Notably, transcript levels of SOCS1 and SOCS3 correlated with esophageal and peripheral eosinophilia in EoE patients ($r = 0.41$, $P < 0.05$ and $r = 0.46$, $P < 0.005$, respectively; Spearman rank correlation). Moreover, a strong correlation was found between eosinophils and eotaxin-3 ($r = 0.56$, $P < 0.0002$) or eosinophils and CCR3 ($r = 0.44$, $P = 0.006$) (data not shown).

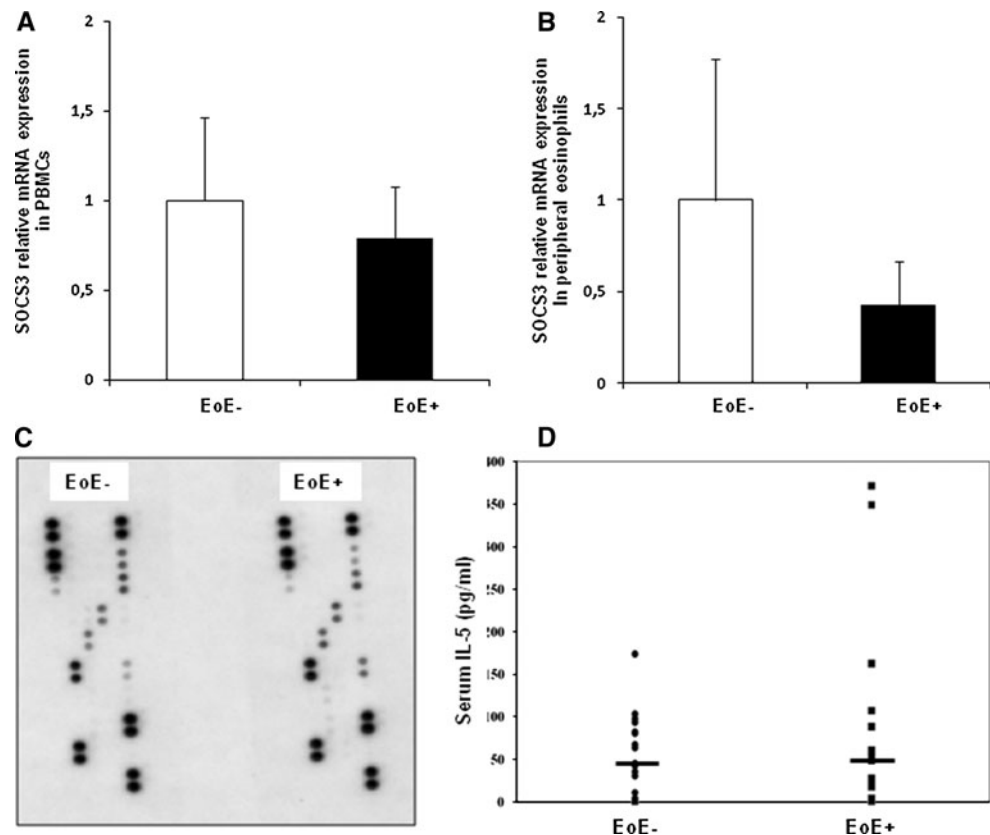
Eosinophils, which are a plentiful source of SOCS1 and SOCS3 [25], play a main role in EoE pathogenesis by producing different mediators that can activate, regulate, and act as effector molecules in different processes. This finding point at the SOCS protein, produced by eosinophils and by other cells, is a potential regulator implicated in EoE pathogenesis. These data is corroborated by our correlation studies, in which we found significant Spearman correlations between SOCS1, SOCS3 and the rest of genes measured (IL-5, CCL26, CCR3 and IL-13). A recent report showed that IL-13 was overproduced in the esophageal tissue of EoE patients and there was a correlation between IL-13 mRNA and eotaxin expression [26], in our study we also obtained a marked increase of IL-13 mRNA (10.5-fold) in esophageal biopsies from EoE patients compared with those from healthy individuals, and moreover we found a positive correlation between IL-13 and SOCS1.

Table 3 Correlation between SOCS1, SOCS3 and genes studied

| | SOCS1 | SOCS3 |
|-------|------------------------|------------------------|
| SOCS3 | <0.0001 ($r = 0.9$) | |
| IL-5 | <0.0001 ($r = 0.80$) | 0.0004 ($r = 0.70$) |
| CCL26 | <0.0001 ($r = 0.60$) | 0.0007 ($r = 0.50$) |
| CCR3 | <0.0001 ($r = 0.59$) | <0.0001 ($r = 0.68$) |
| IL-13 | <0.01 ($r = 0.36$) | NS ($r = 0.25$) |
| MAPK1 | <0.0001 ($r = 0.70$) | <0.0001 ($r = 0.63$) |

¹ Two-tailed P value (r). Spearman correlation r and P values were calculated to test correlation between the ranked genes levels (nonparametric)

Fig. 5 Similar inflammatory cytokines and SOCS3 levels found at the systemic level between the EoE and the control group. SOCS3 real-time quantitative PCR from PBMCs (a) and eosinophils (b) purified from blood samples of EoE patients and control subjects. White bars represent the control group (mean \pm SD, $n = 17$), and black bars the EoE group (mean \pm SD, $n = 25$). c Human cytokine array panel was performed with a pool of serum samples of EoE patients and the control group. IL-5 (d) levels were measured by ELISA in serum samples of 25 EoE patients and 17 control subjects



The present study also identified ERK as an important director of EoE regulation, probably through the SOCS route. Several findings support this conclusion, thus in different cells a link has been demonstrated between ERK activation and SOCS3 accumulation [27–29].

SOCS may stimulate esophageal cells to induce eosinophil-selective chemoattractants in the esophagus of EoE patients. Eosinophils in turn produce more SOCS protein, and thus the up-regulation loop is maintained in the esophagus. One of these chemoattractants is eotaxin-3 (CCL26), which plays an important role in eosinophil migration [30, 31]. Eotaxin-3 is, together with IL-5, one of the most highly expressed genes in human EoE, and epithelial cells are the major source of eotaxin-3 in the human esophagus [32]. It has been described that IL-5 plays a pivotal role in regulating esophageal eosinophilia [33–35] and also in esophagus remodeling [2]. In our study, we obtained elevated levels of IL-5, IL-13, eotaxin-3, and CCR3 mRNA expression in the esophagus of EoE patients. Recently, Blanchard et al. [36], have performed a study of esophageal cytokine expression profile in eosinophilic esophagitis and they have reached similar results.

Eotaxin-3 mediates its biological effect through the ERK pathway [37, 38]. Our data show an increased expression of pERK in esophageal tissue and a strong correlation was found between MAPK1 and SOCS1 and 3 ($P < 0.0001$), and it is possible that, together with other cytokines and chemokines (IL-5, eotaxin-3), it enhances activation of eosinophils in EoE. In fact, activation of ERK may induce both degranulation and chemotaxis of eosinophils [38]. In conclusion, we have demonstrated that the esophageal biopsies of EoE patients exhibit increased expression of SOCS1 and SOCS3 mRNA and protein. SOCS proteins probably contribute to EoE pathogenesis by directly or indirectly inducing Th2 profile, as well as by promoting the production of Th2 cytokines.

Better understanding of the mechanism by which eosinophils promote tissue injury in the esophagus should contribute to the development of novel therapeutic approaches for blocking eosinophil recruitment in the esophagus and/or reversing the harmful consequences of eosinophil recruitment. The identification of SOCS in the pathogenesis of EoE suggests that targeting this molecule may hold promise for the treatment of EoE.

All these findings further enhance our understanding of the mechanism of EoE, and accumulating evidence suggests that EoE pathogenesis is likely to be due to misregulation of immunological pathways.

Acknowledgments The authors recognize Oliver Shaw for his revision and editing in English and Ignacio Mahillo for statistical support.

Conflict of interest Victoria del Pozo received a research grant from as the Health Research Fund (PIS09/0153 *Fondo de Investigación*

Sanitaria) and CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), a Carlos III Institute of Health initiative; Joaquín Sastre is a consultant to Mundipharma, Merck, GSK and Stallergens; all other authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Furuta GT, Liacouras CA, Collins MH, Gupta SK, Justinich C, Putnam PE, et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. *Gastroenterology*. 2007;133:1342–63.
2. Noel RJ, Putnam PE, Rothenberg ME. Eosinophilic esophagitis. *N Engl J Med*. 2004;351:940–1.
3. Straumann A, Simon HU. Eosinophilic esophagitis: escalating epidemiology? *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:418–9.
4. Rothenberg ME. Biology and treatment of eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology*. 2009;137:1238–49.
5. Liacouras CA, Furuta GT, Hirano I, Atkins D, Attwood SE, Bonis PA, et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 128:3–20.
6. Blanchard C, Rothenberg ME. Basic pathogenesis of eosinophilic esophagitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2008;18:133–43.
7. Gupta SK, Fitzgerald JF, Kondratyuk T, HogenEsch H. Cytokine expression in normal and inflamed esophageal mucosa: a study into the pathogenesis of allergic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006;42:22–6.
8. Straumann A, Bauer M, Fischer B, Blaser K, Simon HU. Idiopathic eosinophilic esophagitis is associated with a t(h)2-type allergic inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108: 954–61.
9. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:503–29.
10. Barrett NA, Austen KF. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity*. 2009;1:425–37.
11. Palmer DC, Restifo NP. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol*. 2009;30:592–602.
12. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol*. 2003;4:1169–76.
13. Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19:414–22.
14. Dimitriou ID, Clemenza L, Scotter AJ, Chen G, Gerra FM, Rottapel RL. Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunol Rev*. 2008;224:265–83.
15. Cassel SL, Rothman PB. Chapter 3: role of SOCS in allergic and innate immune responses. *Adv Immunol*. 2009;103:49–76.
16. Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:980–5.
17. Yoshimura Y, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation. *Nat Immunol*. 2007;7:454–65.
18. EAACI Subcommittee of Skin Test and Allergen Standardization. Skin tests used in type I allergy testing. *Allergy*. 1989;44(s10): 13–60.
19. Niemeijer NR, Goedewaagen B, Kauffman HF, de Monchy JG. Optimization of skin testing. I. Choosing allergen concentrations and cut off values by factorial design. *Allergy*. 1993;48(7):491–7.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method. *Methods*. 2001;25:402–8.

21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
22. Liacouras CA, Spergel JM, Ruchelli E, Ruchelli E, Verma R, Mascarenhas M, et al. Eosinophilic esophagitis: a 10-year experience in 381 children. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3:1198–206.
23. Baxi S, Gupta SK, Swigonski N, Swigonski N, Fitzgerald JF. Clinical presentation of patients with eosinophilic inflammation of the esophagus. *Gastrointest Endosc.* 2006;64:473–8.
24. Spergel JM, Brown-Whitehorn TF, Beausoleil JL, Franciosi J, Shuker M, Verma R, et al. 14 years of eosinophilic esophagitis: clinical features and prognosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48:30–6.
25. López E, Zafra MP, Sastre B, Gámez C, Fernández-Nieto M, Sastre J, et al. Suppressors of cytokine signaling 3 (SOCS3) expression in eosinophils: regulation by PGE2 and Th2 cytokines. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:917015.
26. Blanchard C, Mingler MK, Vicario M, Abonia JP, Wu YY, Lu TX, et al. IL-13 involvement in eosinophilic esophagitis: transcriptome analysis and reversibility with glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:1292–300.
27. Sands WA, Woolson HD, Milne GR, Rutherford C, Palmer TM. Exchange protein activated by cyclic AMP (Epac)-mediated induction of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in vascular endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 2006;26:6333–46.
28. Borland G, Bird RJ, Palmer TM, Yarwood SJ. Activation of protein kinase Calpha by EPAC1 is required for the ERK- and CCAAT/enhancer-binding protein beta-dependent induction of the SOCS-3 gene by cyclic AMP in COS1 cells. *J Biol Chem.* 2009;284:17391–403.
29. Dellon ES, Bower JJ, Keku TO, Chen X, Miller CR, Woosley JT, et al. Markers of tyrosine kinase activity in eosinophilic esophagitis: a pilot study of the FIP1L1-PDGFR α fusion gene, pERK 1/2, and pSTAT5. *Dis Esophagus.* 2012;25(2):166–74.
30. Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:227–42.
31. Kita H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev.* 2011;242(1):161–77.
32. Blanchard C, Wang N, Stringer KF, Mishra A, Fulkerson PC, Abonia JP, et al. Eotaxin-3 and a uniquely conserved gene-expression profile in eosinophilic esophagitis. *J Clin Invest.* 2006;116:536–47.
33. Brown-Whitehorn TF, Spergel JM. The link between allergies and eosinophilic esophagitis: implications for management strategies. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010;6:101–9.
34. Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, Rothenberg ME, et al. IL-5 promotes eosinophil trafficking to the esophagus. *J Immunol.* 2002;168:2464–9.
35. Mishra A, Wang M, Pemmaraju VR, Collins MH, Fulkerson PC, Abonia JP, et al. Esophageal remodeling develops as a consequence of tissue specific IL-5-induced eosinophilia. *Gastroenterology.* 2008;134:204–14.
36. Blanchard C, Stucke EM, Rodriguez-Jimenez B, Burwinkel K, Collins MH, Ahrens A, et al. A striking local esophageal cytokine expression profile in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:208–17.
37. Pintucci G, Moscatelli D, Saponara F, Biernacki PR, Baumann FG, Bizakis C, et al. Lack of ERK activation and cell migration in FGF-2-deficient endothelial cells. *FASEB J.* 2002;16:598–600.
38. Kampen GT, Stafford S, Adachi T, Jinquan T, Quan S, Grant JA, et al. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood.* 2000;95:1911–7.

Gene Silencing of SOCS3 by siRNA Intranasal Delivery Inhibits Asthma Phenotype in Mice

M^a Paz Zafra^{1,2}, Carla Mazzeo^{1,2}, Cristina Gámez^{1,2}, Ainara Rodriguez Marco¹, Ana de Zulueta^{1,2}, Veronica Sanz^{1,2}, Izaskun Bilbao^{2,3}, Jesús Ruiz-Cabello^{2,3}, Jose M. Zubeldia⁴, Victoria del Pozo^{1,2*}

1 Department of Immunology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain, **2** CIBER de Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain, **3** Advanced Imaging Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, and Universidad Complutense Madrid, Madrid, Spain, **4** Allergy Section and Experimental Medicine Unit, Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain

Abstract

Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins regulate cytokine responses and control immune balance. Several studies have confirmed that SOCS3 is increased in asthmatic patients, and SOCS3 expression is correlated with disease severity. The objective of this study was to evaluate if delivering of SOCS3 short interfering RNA (siRNA) intranasally in lungs could be a good therapeutic approach in an asthma chronic mouse model. Our results showed that intranasal treatment with SOCS3-siRNA led to an improvement in the eosinophil count and the normalization of hyperresponsiveness to methacholine. Concomitantly, this treatment resulted in an improvement in mucus secretion, a reduction in lung collagen, which are prominent features of airway remodeling. The mechanism implies JAK/STAT and RhoA/Rho-kinase signaling pathway, because we found a decreasing in STAT3 phosphorylation status and down regulation of RhoA/Rho-kinase protein expression. These results might lead to a new therapy for the treatment of chronic asthma.

Citation: Zafra MP, Mazzeo C, Gámez C, Rodriguez Marco A, de Zulueta A, et al. (2014) Gene Silencing of SOCS3 by siRNA Intranasal Delivery Inhibits Asthma Phenotype in Mice. PLoS ONE 9(3): e91996. doi:10.1371/journal.pone.0091996

Editor: Hongwei Gao, Harvard Medical School, United States of America

Received: November 22, 2013; **Accepted:** February 16, 2014; **Published:** March 17, 2014

Copyright: © 2014 Zafra et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants P509/00153 and PI12/00691 and CIBER de Enfermedades Respiratorias; from Spain's Health Research Fund, a Carlos III Institute of Health initiative; and fellowship grants from the Conchita Rabago Foundation (PZ). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: vpozo@fjd.es

Introduction

Asthma is a disorder of the conducting airways that leads to variable airflow obstruction in association with airway hyperresponsiveness. It is characterized by inflammatory cell infiltration, mainly of eosinophils and lymphocytes, and reversible bronchoconstriction. As the disease becomes more severe, the airway acquire an altered repair response, and structural changes cause remodeling due to the secretion of factors and cytokines that induce mucous cell metaplasia, angiogenesis, and subepithelial fibrosis [1,2].

Cytokines are one of the main soluble molecules that participate in the initiation, perpetuation, execution, and resolution of the inflammatory response. Therefore, tight control of cytokine production and function is required to prevent an imbalance in the magnitude, duration, and remission of the immune response. SOCS proteins are recognized as an important mechanism in the negative regulation of several cytokine pathways, and more recent studies have revealed that SOCS proteins play additional roles in many immunological processes as asthma [3,4].

The cytokine profile in asthma is typified by interleukin (IL-) 4, IL-5, and IL-13 that are typical Th2 cytokines. These cytokines bind to membrane receptors to activate complex signal transduction pathways. SOCS is a family of molecules that suppress the JAK-STAT signaling pathway and regulate Th cell differentiation. SOCS3 is an inhibitor that is relatively specific to STAT3; in addition, it can inhibit other signaling pathways such as Ras/ERK

and PI3K, which affect cell proliferation, survival, and differentiation [5,6]. Th2 cells contain high levels of SOCS3 proteins. Our group has recently described and increased SOCS3 expression in eosinophils from asthmatic patients [7].

In patients with asthma and atopic dermatitis, the expression levels of SOCS3 transcripts in T cells are closely correlated with serum IgE levels and disease severity [8,9,10]. Previously, transgenic expression of SOCS3 in T cells resulted in increased Th2 cell production, airway eosinophilia, and airway hyperresponsiveness (AHR) in a murine model of OVA-allergic asthma [8]. In fact, T cell treatment with SOCS3-siRNA has been demonstrated to suppress the development of allergic inflammation in another murine model of asthma [11].

Gene silencing by RNA interference, in which the expression of the target gene is silenced in a post-transcriptional manner, has arisen as a potential treatment for many diseases. The intranasal administration of naked siRNA has opened new possibilities in drug delivery and respiratory therapy [12,13]. Therefore, we have developed a therapeutic approach in a murine model of chronic asthma by delivering SOCS3-siRNA intranasally.

Methods

Ethics statement

All experimental procedures were carried out in strict accordance with the international and national (Real Decreto 1201/2005) guidelines and were approved by the Fundación Jiménez

Diaz Animal Research Ethics Committee. All protocols were performed under conditions to minimize animal suffering.

Animals

Male A/J mice (specific pathogen-free, 5 weeks old) were purchased from Harlan Iberica. A total of 68 animals were included in the study. Mice were assigned to 4 experimental groups: saline solution group (SS, $n = 17$), ovalbumin-sensitized group (OVA, $n = 16$), ovalbumin-sensitized non-target siRNA-treated group (OVA siNT, $n = 16$), and ovalbumin-sensitized SOCS3 siRNA-treated group (OVA siSOCS3, $n = 19$).

Recombinant proteins and reagents

Ovalbumin (OVA) grade V was purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA). Antibodies against phospho-STAT3 (Ser⁷²⁷), STAT3, SOCS3, and β -actin were obtained from Cell Signaling Technology (MA, USA); anti-mouse ROCK-2 was acquired from Sta Cruz Biotech (CA, USA), and anti-mouse RhoA was purchased from Cytoskeleton (CO, USA). Flow cytometry antibodies (anti-mouse CD49d PE, CD3 PE, and CD19 FITC) were all purchased from BD (NY, USA).

Chronic asthma model

Mice were sensitized on days 0 and 14 by intraperitoneal injection of 10 μ g OVA (grade V; Sigma Aldrich, MO, USA) and 20 mg Al(OH)₃ in PBS. Then, mice were immunized during five weeks, four times per week, starting on day 27 and finishing on day 58, by placing them in a small box, where they were later anesthetized with inhaled isoflurane (Forane, Abbot, IL, USA) and then immunized with 15 μ l of OVA (1 mg/ml) or saline solution (SS) intranasally; 24 hours after the last OVA administration, mice were sacrificed. The followed protocol is further detailed by S. Miyamoto et al. [14].

Design and delivery of siRNA *in vivo*

The Accel siRNA SMART-pool duplexed of 4 predesigned mouse SOCS3-siRNA (# 1-4) were purchased from Dharmacon (IL, USA). The siRNA sequences specific for mouse SOCS3 (#1: sense 5'-GCCUCAACACUUUUUAAU-3', antisense 5'-PUUAUAAAAGUGAUUGAGGCUU-3'; #2: sense 5'-GAUUGAUGCUCACUUUUAAU-3', antisense 5'-PUUAAAGUGGAGCAUCAUACUU-3'; #3: sense 5'-CUGUUUUGAAUAAUGUUUAAU-3', antisense 5'-PUAAACAUAUUCAAAACAGUU-3'; #4: sense 5'-GGGGAAUCUCAAACUUUCUU-3', antisense 5'-PGAAAGUUUGAAGAUUCCCCUU-3') were selected, synthesized, and annealed by the manufacturer. Additionally, a non-target siRNA scrambled duplex from Dharmacon was used (sense 5'-UGUUUACAUGUCGACUAAU-3', antisense 5'-PUUAGUCGACAUGUAAACCAUU-3'). SOCS3-siRNA and non-target siRNA were dissolved in RNase-free water and then given intranasally at a volume of 15 μ l, previously each animal was lightly anesthetized using isoflurane. After the first sensitization with OVA, a total of 10 doses of siRNA were administered every 3 days. To determine the effective SOCS3-siRNA dose, different concentrations were tested (2-20 μ M) in mice with chronic asthma. The optimal siRNA concentration selected was 2 μ M.

Confocal microscopy

Accell Cyclophilin B siRNA rhodamine labeled was purchased from Dharmacon and instilled intranasally into the mice. Twenty-four and 48 hours after the siRNA instillation, frozen lung sections

were observed by confocal microscopy (Leyca Microsystems, Weztlar, Germany) at an excitation wavelength of 547 nm.

Determination of airway responsiveness to methacholine

Mice airway responsiveness was assessed in all animal groups 1 day before the animals were sacrificed. Four individual whole body plethysmography chambers, obtained from Buxco, were used as described previously [15]. Enhanced pause (Penh), a parameter that correlates with measurement of airway resistance, was used to perform the analysis.

X-ray CT

In vivo CT imaging was performed on a nanoPET/CT small-animal imaging system (Bioscan, Washington, DC) equipped with a micro-focus X-ray source and a high-resolution radiation-imaging device featuring a 1024 \times 3596 pixel photodiode array with a pixel pitch of 48 μ m. The mice were intraperitoneally anesthetized with ketamine/xylazine (100 mg/10 mg per kg of body weight) and positioned in a thermoregulated (38.7°C) mouse bed with an ophthalmic gel in their eyes to prevent retinal drying.

The scan parameters used for the CT measurements were 360 projections/rotations, 55 kV (peak) 145 μ A current, and a detector pixel size of 141 μ m.

Acquisition and reconstruction were performed using proprietary Nucline software (Mediso; Budapest, Hungary). The effects induced by intranasal challenge with ovalbumin were observed by Hounsfield Unit density change and volume change quantified manually using Osirix software (Pixmeo, Switzerland). The appropriate CT images were preset at the lung window setting (-400 center, 1240 HU width).

Fluorescence molecular tomography (FMT)

A tail vein injection of 2 nmol of ProSense 680 agent (Perkin Elmer, MA, US) resuspended in 150 μ l of saline was performed in all mice at day 58, 4 hours after the final intranasal administration of OVA. For this application, the mice were anesthetized with 2% isoflurane. Twenty hours after the fluorescence agent delivery, all mice were imaged using an FMT 1500 fluorescence tomography system (Perkin Elmer) after depilation to minimize interference with the fluorescence signal. Immediately before imaging, the mice were anesthetized using an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (100 μ l per 10 g of animal) and positioned carefully in the FMT chamber with ophthalmic gel in their eyes to prevent retinal drying. The resulting 3D data were reconstructed and the region of interest (ROI) was defined within the chest area using TrueQuant 3D software to obtain quantifications. The same threshold was applied to all animals.

Bronchoalveolar lavage (BAL), cell analysis

Twenty-four hours after the last administration of the antigen, the mice were anesthetized and lung lavages were performed 3 times with 0.5 ml of sterile PBS. The cells obtained were counted in a Neubauer chamber and used for cytometric analysis in a FACS CANTO II cytometer (BD, NY, USA).

Tissue processing and histological analysis

The right lung of each mouse was extracted while the animal was under terminal anaesthesia; the lung was then immersed in 4% paraformaldehyde. Five-micrometer sections were stained with H&E to assess general morphology. Mucous-secreting goblet cells were visualized on periodic acid-Schiff (PAS), and Masson Trichrome stain was used to evaluate for subepithelial fibrosis. Cell infiltration in the tissue specimens was assessed by counting the

number of cells through a semiautomatic method and Image J software was used for imaging analysis. These analyses were performed in a blind fashion, and the slides were presented in random order for each examination.

Immunoblot

Protein extracts from mice lungs (20 µg of total protein) were resolved on SDS-PAGE and probed with specific Abs at the appropriate dilution (phospho-STAT3 1:500, STAT3 1:1000, SOCS3 1:500, RhoA 1:500, ROCK-2 1:1000, β-Actin 1:2000). Chemiluminescent protein bands were detected using an ECL detection system (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's protocol.

RNA isolation, RT-PCR, and TaqMan gene expression assays

Mice lungs were homogenized previously and then total RNA was isolated following the Trizol reagent protocol (Invitrogen, CA, USA). RNA was measured by spectrophotometry, and 1 µg of RNA was reverse-transcribed to cDNA using a high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK).

Quantitative real-time PCR was performed on a 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). TaqMan gene expression master mix and TaqMan gene expression assay probes (SOCS3, SOCS1, IL-13, IL-4, IL-5, IFNγ, IL-10, and IL-17A) were obtained from Applied Biosystems and were used for qRT-PCR to determine mRNA levels. Messenger RNA was calculated for each sample using the cycle threshold (C_t) value. The relative gene expression was calculated as follows: $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ target gene}} - \Delta C_{t \text{ actin}}$ [16].

RNA quality control and miRNA microarray analysis

Total RNA was isolated from the lungs using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The integrity and quantification of each total RNA extract was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) and unqualified samples were rejected. A total of 5 µg of purified RNA samples was submitted to the Gene Expression Department of Complutense University (Madrid, Spain). In total, 16 samples were analyzed: 4 from the OVA group, 4 from the OVA siNT group, 4 from the OVA siSOCS3 group, and 4 from the SS group. Following all appropriate protocols and procedures for quality control, labeling, and fragmentation of total RNA, the biotin-labeled cRNA samples were hybridized to GeneChip miRNA 3.0 Array (Affimetrix, CA, USA) according to manufacturer protocols.

The microarray normalization process was determined with the software GeneChip Expression Console (Affimetrix). Data were standardized using the RMA+DABG algorithm. Functional analysis was carried out using the Babelomics suite (<http://www.babelomics.org/>). Differential gene expression was conducted using the Limma package from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>). To account for multiple testing effects, P values were corrected using the false discovery rate. Differentially detected signals were accepted as true when ratios of the P value were less than 0.01. Results were finally given in terms of "fold induction."

Determination of total serum IgE and OVA-specific IgE, IgG1, and IgG2A

At the time of sacrifice, blood samples were collected by cardiac puncture, and the sera were stored at -80°C until use. Total

serum IgE and OVA-specific IgE, IgG1, and IgG2A were measured by ELISA (BD Biosciences/BD Pharmingen, NJ, USA).

Results

Localization of siRNA into lung following single intranasal administration in mice

Firstly, we performed an assay to determine whether naked siRNA delivered intranasally reached the lung intact and was not degraded by RNases in lung airways. After instillation of control siRNA labeled (2 µM) with a fluorophore (Rhodamine) in the airways, red fluorescence was observed by confocal microscopy in response to the 547 nm laser beam. As shown in Figure 1A, strong red fluorescence was localized in the lungs, predominantly in the peribronchial epithelial cells either 24 or 48 hours after administration. No fluorescence was observed in the lungs of the control group.

SOCS3 evaluation after instillation in a chronic asthma model

We set out to study SOCS3 gene expression and encoded protein in lung tissue by quantitative PCR and Western blotting after SOCS3-siRNA therapy. The plot in Figure 1B shows how SOCS3 gene expression was inhibited in the lungs of mice that received SOCS3-siRNA therapy (OVA siNT vs OVA siSOCS3, $P < 0.05$).

The immunoblotting analysis confirmed these results (Fig. 1C). Thus, both the group treated with SOCS3-siRNA and the control group showed similar SOCS3 protein expression (47 vs 58 arbitrary units; $P > 0.05$), i.e. a strong inhibition relative to the OVA and OVA siNT groups ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively; Fig. 1D).

To assess whether the SOCS3-siRNA delivery had caused an alteration in other important regulators belonging to the same family, new measures of SOCS1 mRNA relative levels revealed no change in this gene expression (see Figure S1).

Finally, to further analyze whether the silence therapy had affected other organs, SOCS3 quantitative PCR was performed in liver and spleen from all mice and we observed that SOCS3-siRNA treatment did not alter SOCS3 gene expression in tested organs (see Figures S2 and S3).

Reduced inflammation and airway hyperresponsiveness after SOCS3 silencing

Airway function was assessed using whole body plethysmography 24 hours before sacrifice. OVA and OVA siNT-treated mice developed a significantly enhanced response to methacholine when compared to saline animals (Fig. 2A). As expected, SOCS3 siRNA-treated mice displayed significantly inhibitory responses to cholinergic stimulation with different methacholine doses (6, 12, and 24 mg/ml) when compared to the other asthmatic groups. Therefore, SOCS3-siRNA therapy protected against methacholine-induced AHR.

Typical micro-CT images from each group are illustrated in Figure 2B. There is an increase in density units in animal lungs from the OVA and OVA siNT-treated groups (478 ± 271 HU), as can be observed in the images (Fig 2B, panels 2 and 3). In mice treated with SOCS3-siRNA, a 2.7-fold reduction in HU was obtained (178.75 ± 60.813 HU), although these differences did not reach statistical significance (Fig 2B, panel 4).

3D FMT imaging in multiple animals (Fig. 2C) displays a similar pattern and extension of fluorescence signal in OVA and OVA siNT-treated mice. Similarly, control and SOCS3

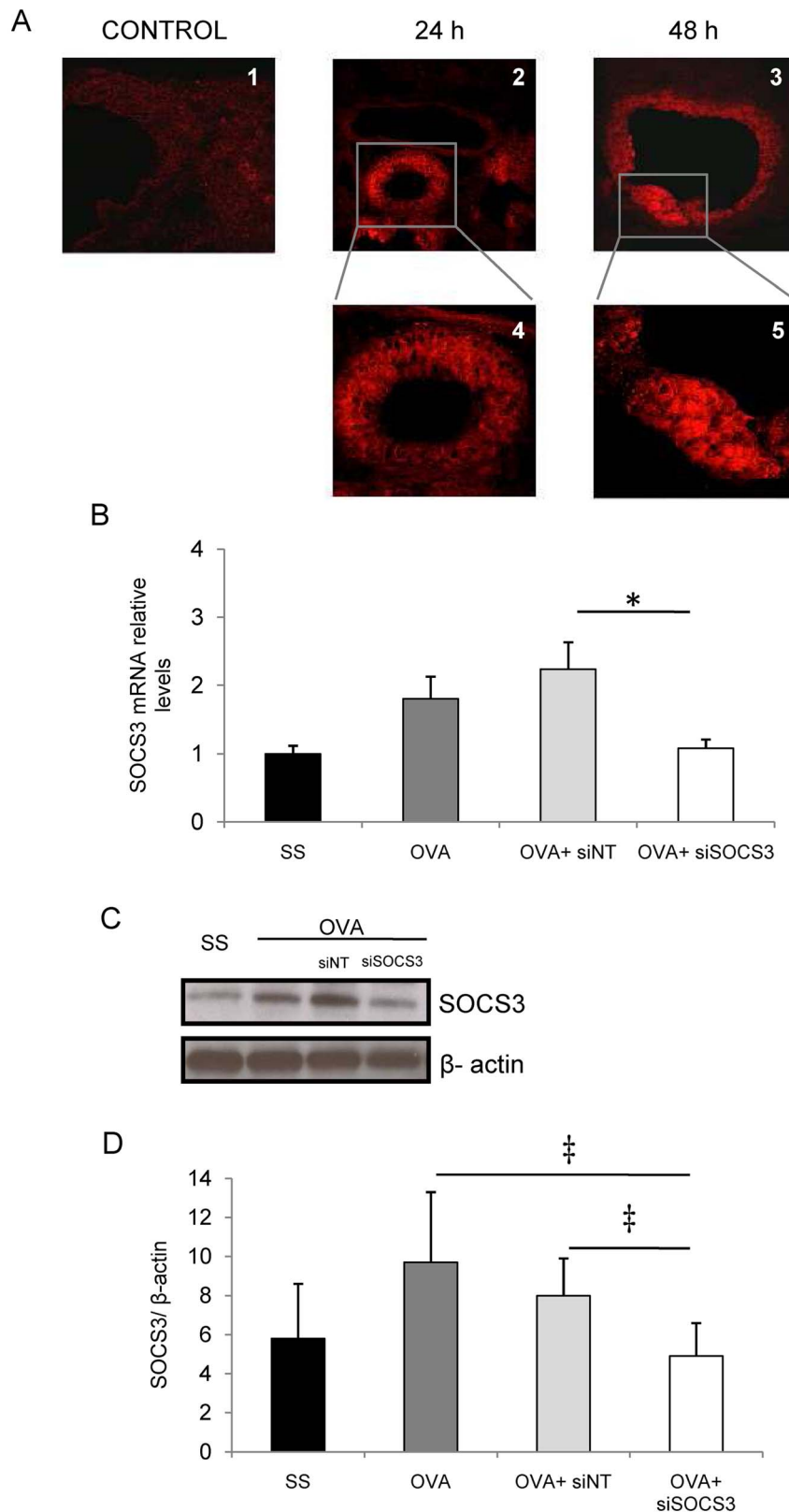


Figure 1. SOCS3 gene silencing in lung. **A.** Red-labeled siRNA localization in mouse lung after intranasal delivery determined by confocal microscopy. 2 μ M of siRNA was administered. 1: control mouse lung after 48 h after administration of distilled water. 2 and 4: Lung airway images after 24 h from siRNA delivery. 3 and 5: Lung airways 48 h after siRNA administration. **B.** Relative SOCS3 mRNA levels were determined by real-time quantitative PCR. The results show relative gene expressions as determined by the $\Delta\Delta C_T$ method. **C.** SOCS3 Western blot analysis from lungs was achieved using an antibody against SOCS3 and β -actin. Lane 1: lung lysate from the SS group; lane 2: lung lysate from the OVA group; lane 3: lung lysate from the OVA+siNT group; and lane 4: lung lysate from the OVA+siSOCS3 group. β -actin was used as a loading control. The picture is a

representative example of several mice, all displaying similar results. **D.** SOCS3 bands were quantified by densitometry. SS group (mean \pm SD, $n = 13$); OVA group (mean \pm SD, $n = 12$); OVA siNT-treated group (mean \pm SD, $n = 12$); OVA siSOCS3-treated group (mean \pm SD, $n = 15$). $\dagger P < 0.001$ and $* P < 0.05$ between groups.

doi:10.1371/journal.pone.0091996.g001

siRNA-treated mice show a decrease in fluorophore concentration (ProSense 680 nm). The concentrations derived from FMT (Fig. 2D) performed in asthmatic (OVA and OVA siNT) mice were 106 ± 13 pmol/lung in transient SOCS3 knock-down versus 174 ± 10 and 187 ± 26.2 pmol/lung, respectively; $P < 0.05$.

Cellular airway inflammation is a pivotal event in OVA-induced airway sensitization and, as expected, the SOCS3-siRNA treatment produced changes in the total number and composition of cells from the BAL. Figure 3A shows that after SOCS3-siRNA therapy, the absolute number of BAL cells significantly decreased in comparison to the OVA group ($11.8 \pm 7.1 \times 10^5$ cells versus $59.6 \pm 35.1 \times 10^5$ cells, $P < 0.001$).

Flow cytometry was used to evaluate the percentage of different cell subpopulations in BAL. As shown in Fig. 3B, treatment with SOCS3-siRNA altered the cellular profile, resulting in a significant reduction in eosinophils (a 41% decrease) in BAL fluid ($P < 0.05$). We did not find any significant changes in other leukocyte populations measured, such as neutrophils or lymphocytes T and

B. These results indicate that administration of SOCS3-siRNA into the lung modulates allergen-induced BALF eosinophilia.

Histopathologic examination

SOCS3-siRNA treatment resulted in a reduction of inflammatory infiltrates in the perivascular and peribronchial regions in mice lungs (Fig. 4D) compared to OVA, and OVA siNT groups (Fig. 4B and C). These infiltrates were quantified by semiautomatic analysis and the results are presented in Figure 4E.

SOCS3-siRNA therapy abrogates mucous presence and reduces collagen deposits in the airways

Excessive mucous secretion from hyperplastic goblet cells is also a characteristic feature of the asthmatic airway. To determine if the extent of mucous cell metaplasia following SOCS3 knockdown is modified, paraffin-embedded sections of lung were stained with PAS that stains mucous-producing goblet cells in asthmatic

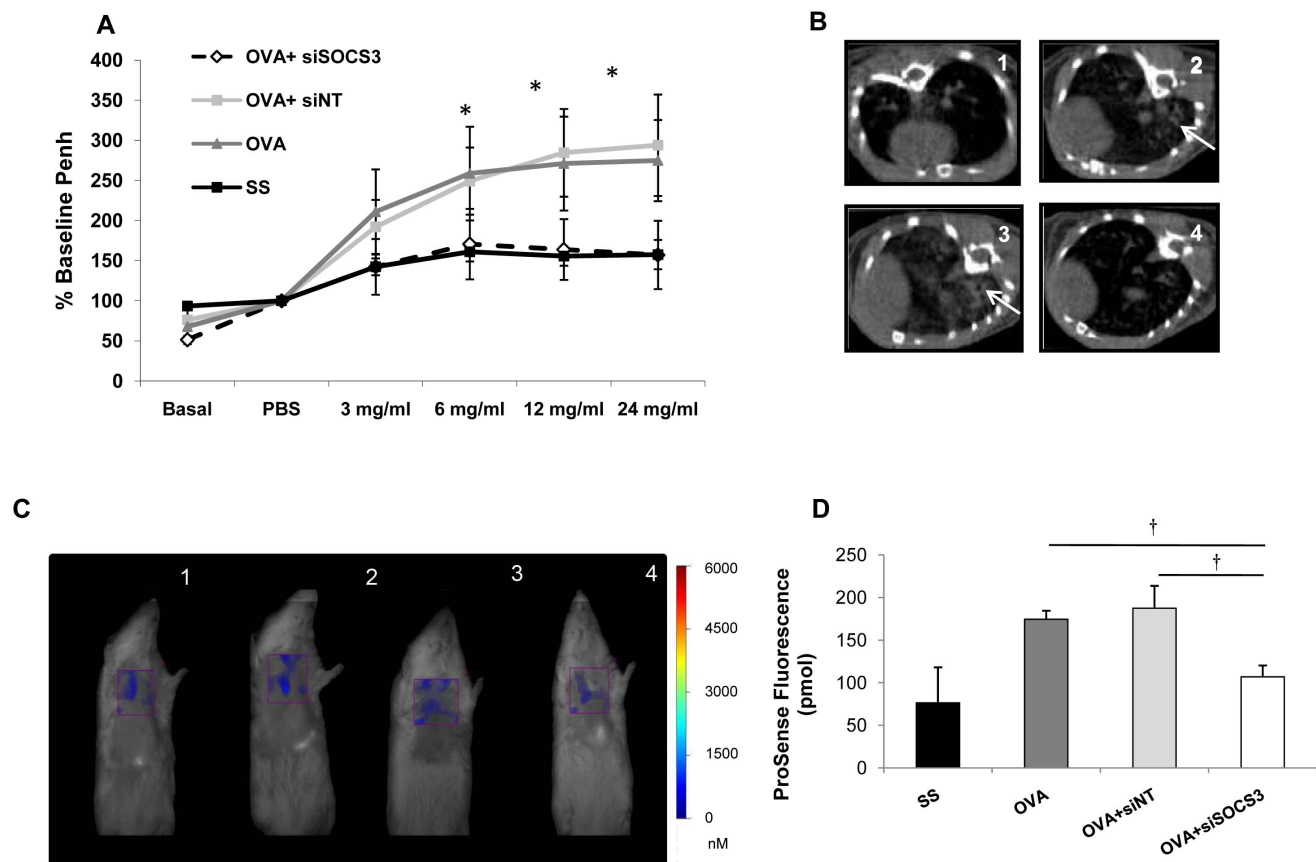


Figure 2. *In vivo* techniques to assess the effect of SOCS3 gene silencing in lungs. **A.** Airway hyperresponsiveness to methacholine challenge. Methacholine dose response curve 24 hours after last OVA administration. Saline group (mean \pm SD, $n = 13$); OVA group (mean \pm SD, $n = 12$); OVA siNT-treated group (mean \pm SD, $n = 12$); and OVA siSOCS3-treated group (mean \pm SD, $n = 15$). **B.** Native axial micro-CT images of the lungs of typical mice from each experimental group, where hyperintense areas (arrow) correspond to tissue with more fluid than normal. 1: SS $n = 4$; 2: OVA $n = 4$; 3: OVA siNT $n = 4$; 4: OVA siSOCS3 $n = 4$. $* P < 0.05$ between groups. **C.** *In vivo* FMT tomographic imaging. Lung fluorescence after ProSense 680 administration in mice. Three-dimensional regions of interest were placed within the lung region. 1: SS group; 2: OVA group; 3: OVA siNT group; 4: OVA siSOCS3 group. **D.** 3D FMT quantification of pulmonary inflammation, expressed as total pmoles per lung \pm S.D. ($\dagger P < 0.01$) of ProSense 680 fluorescence within the lung region of each mouse from all the study groups (SS $n = 4$, OVA $n = 4$, OVA siNT $n = 4$, OVA siSOCS3 $n = 4$). doi:10.1371/journal.pone.0091996.g002

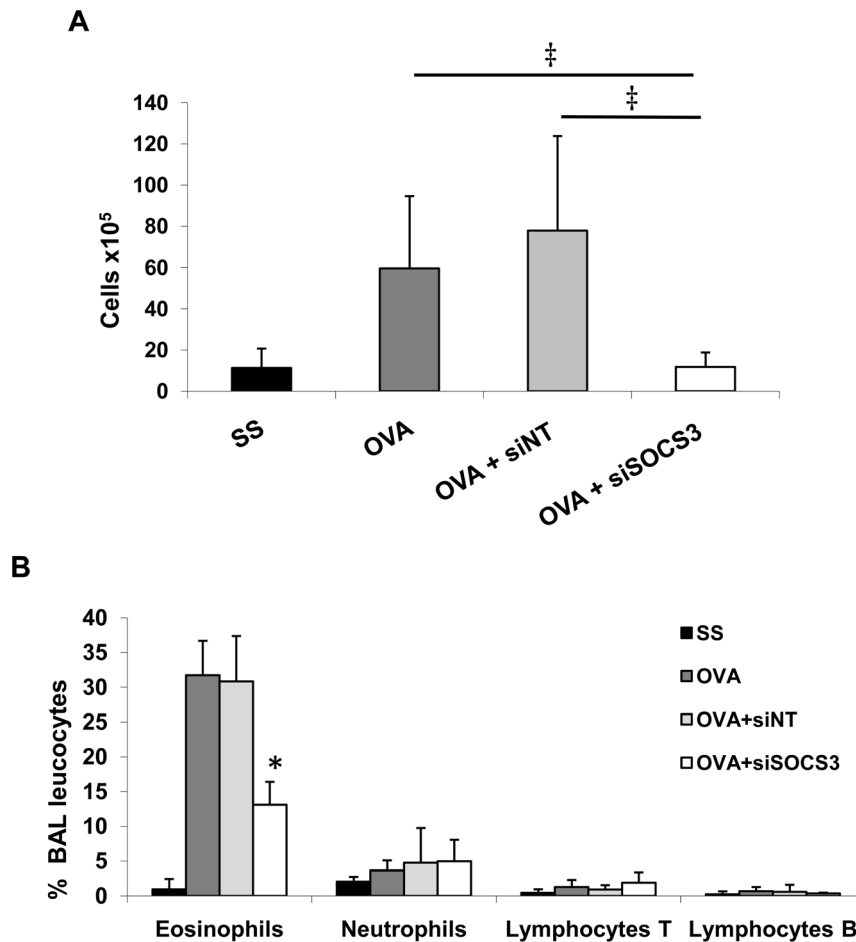


Figure 3. Analysis of cell populations in BAL. **A.** Total cell counts in BAL. **B.** Leukocyte population analysis by flow cytometry in BAL. SS group (mean \pm SD, $n=13$); OVA group (mean \pm SD, $n=12$); OVA siNT-treated group (mean \pm SD, $n=12$); and OVA siSOCS3-treated group (mean \pm SD, $n=15$) $\ddagger P<0.001$ and $*P<0.05$ between groups. doi:10.1371/journal.pone.0091996.g003

airways. In mice with chronic asthma as well as in those treated with the non-target siRNA (Fig. 4G and H), an increase in PAS-positive cells was observed in the bronchial epithelium when compared with saline controls (Fig. 4F). These positive cells almost disappeared in OVA mice that had received SOCS3-siRNA therapy and therefore displayed a similar pattern to that observed in the airways of mice from saline group (Fig. 4I).

Increased collagen deposition is a hallmark of airway remodelling due to prolonged inflammation with chronic asthma. Connective tissue was examined in lung sections stained with Masson Trichrome. Saline mice presented a thin uniform layer of matrix in the peribronchial subepithelial region (Fig. 4J), whereas in chronic asthmatic mice we detected an increase in matrix thickness in the subepithelial layer of the airways as well as in the perivascular regions (Fig. 4K), as shown by the increase in the extent of collagen deposition and intensity of staining. Similar results were obtained for OVA mice treated with the non-target siRNA (Fig. 4L). When asthmatic mice were treated intranasally with SOCS3-siRNA, we found that matrix deposition was consistently abrogated in the same regions (Fig. 4M).

Humoral response was not altered in chronic asthmatic mice after SOCS3 silencing

We also tried to ascertain whether SOCS3-siRNA treatment might alter the humoral immune response. As can be seen in Table 1, determination of serum IgE revealed that after SOCS3-siRNA treatment, total IgE levels were not altered compared with mice with chronic asthma (OVA group). Specific IgG2a and IgG1 measurements against OVA indicated that the response against the Ag was not modified in the SOCS3 silencing group. In this group, however, a slight reduction in OVA-specific IgE level was observed.

Effect of SOCS3 down-regulation on quantitative expression of cytokine genes in lungs

We assessed the effect of SOCS3 silencing on lung cytokine levels. The results indicated that Th2 cytokines (IL-4, IL-13, and IL-5) were increased in mice with chronic-induced asthma ($P<0.05$, Figure 5 A, B, C) when compared with saline mice. When SOCS3-siRNA treatment was delivered, the mRNA levels of IL-4, IL-5, and IL-13 were significantly lower than in the OVA group (Fig. 5A, B and C, $P<0.05$). We also found elevation of INF γ mRNA expression levels in asthmatic mice groups, but no significant changes were found in the levels of INF γ after SOCS3 silencing (Figure 5D).

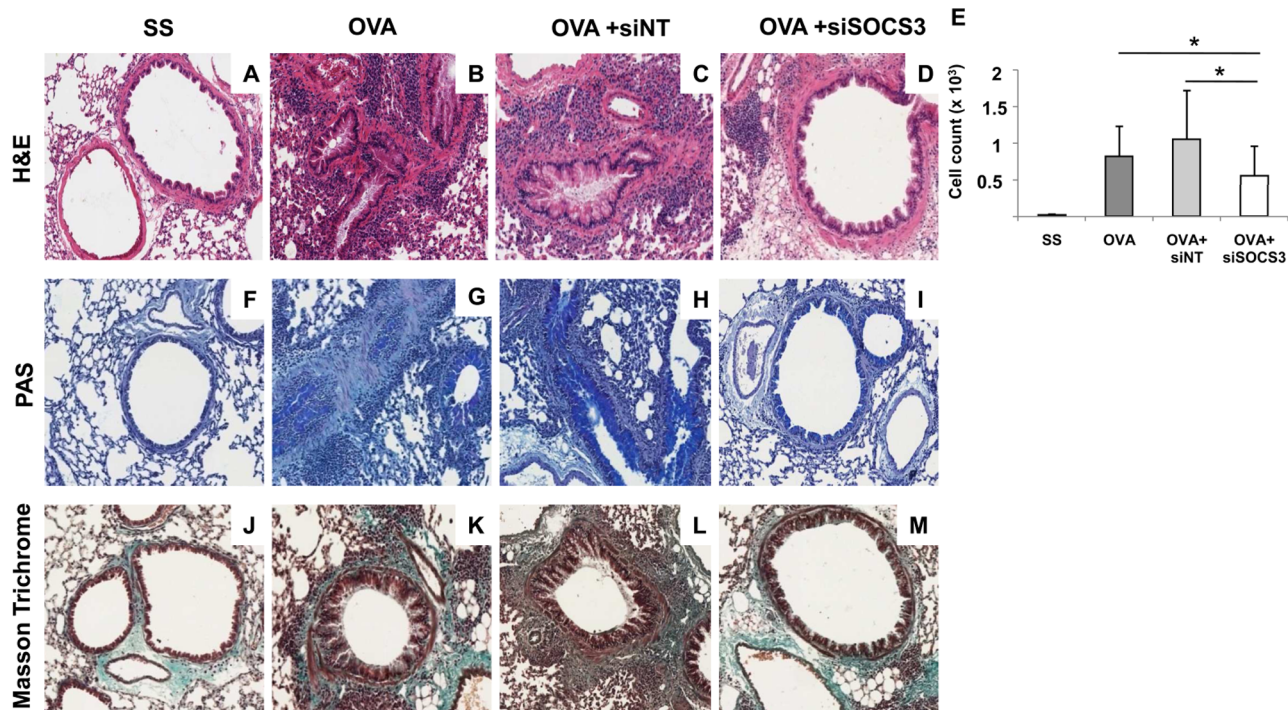


Figure 4. Pulmonary histopathologic findings in chronic asthma: effect of SOCS3-siRNA therapy. Comparison of structural changes in airways of negative control (SS, $n = 13$), untreated positive control (OVA, $n = 12$), non-target siRNA-treated (siNT, $n = 12$), and SOCS3 siRNA-treated (SOCS3-siRNA, $n = 15$) mice shown with H&E (row A–D), PAS (row F–I) and Masson Trichrome (row J–M) staining of lung sections, in at least 3 independent experiments. Representative photomicrographs of excised pulmonary tissue from the saline group are in the first column, the second column presents the OVA group, the third depicts the OVA group, and the SOCS3-siRNA group is represented in the fourth column. **E.** Cell infiltration in the specimens. Saline group (mean \pm SD, $n = 13$); OVA group (mean \pm SD, $n = 12$); OVA siNT-treated group (mean \pm SD, $n = 12$); and OVA siSOCS3-treated group (mean \pm SD, $n = 15$). * $P < 0.05$ between groups. doi:10.1371/journal.pone.0091996.g004

We also evaluated the regulatory axis (IL-10 and IL-17A gene expression). A marked increase in IL-10 mRNA expression, as compared with OVA mice, was achieved in mice with SOCS3 down-regulation, as shown in Figure 5E (10-fold, $P < 0.05$). We further corroborate IL-10 increased production after SOCS3 down-regulation in BAL fluids (Data not shown). By contrast, IL-17A mRNA levels were augmented in OVA mice and inhibited in SOCS3 siRNA-treated mice (Fig. 5F, $P < 0.05$).

In general, mice treated with the non-target siRNA displayed a similar cytokine expression profile than OVA mice; although the non-specific siRNA treatment seems to affect IL-13, IL-10 and IL-17A mRNA relative levels, these alterations do not reach significant differences.

Thus, analysis of the expression levels of several cytokines in the study groups showed that IL-5, IL-13, IL-4, and IL-17A were the predominant mediators down-regulated after SOCS3 silencing; by contrast, IL-10 is up-regulated in the local inflammatory process in airways.

Signaling pathways

The JAK-STAT pathway is activated in chronic asthma. To ascertain STAT3 phosphorylation state after SOCS3-siRNA delivery, we performed a Western blot analysis. STAT3 phosphorylation is induced in OVA and OVA siNT-treated mice, while mice treated with SOCS3-siRNA showed a reduction in pSTAT3 status (Fig. 6A). Figure 6B summarizes the pSTAT3 protein expression quantified by densitometry and normalized with STAT3 levels.

The RhoA/Rho kinase pathway is directly implicated in asthma, promoting bronchoconstriction, airway remodeling, and airway inflammation. In our model, RhoA and ROCK-2 protein expressions were increased in chronic asthmatic mice (OVA and OVA siNT groups). Whereas in mice with SOCS3-siRNA treatment, we found less protein expression of both intermediates: ROCK-2 and RhoA (Fig. 6C). Protein bands were quantified by densitometry; the results are plotted in Figure 6D and 6E, respectively.

MicroRNAs profiling after SOCS3 transient knockdown

Because miRNAs are now recognized as key regulatory elements in gene expression, we determined which miRNAs had modified their expression following SOCS3-siRNA therapy in the

Table 1. Total and specific Ig in serum.

| Group | Specific OVA Ig (O.D)* | | | |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | IgG1 | IgG2 | IgE | Total IgE (ng/ml) |
| SS | 0.05 \pm 0.04 [†] | 0.05 \pm 0.03 [†] | 0.06 \pm 0.02 [†] | 60.2 \pm 67.1 [†] |
| OVA | 0.41 \pm 0.16 | 0.34 \pm 0.22 | 0.12 \pm 0.1 | 130 \pm 25.6 |
| OVA + siRNA NT | 0.49 \pm 0.24 | 0.26 \pm 0.24 | 0.18 \pm 0.13 | 156.1 \pm 58.6 |
| OVA + siRNA SOCS3 | 0.51 \pm 0.28 | 0.32 \pm 0.28 | 0.08 \pm 0.07 | 150.3 \pm 3.3 |

*Ig levels values represented (mean \pm SD) for each group (12–17 mice/group).
[†] $P < 0.05$ vs other groups.

doi:10.1371/journal.pone.0091996.t001

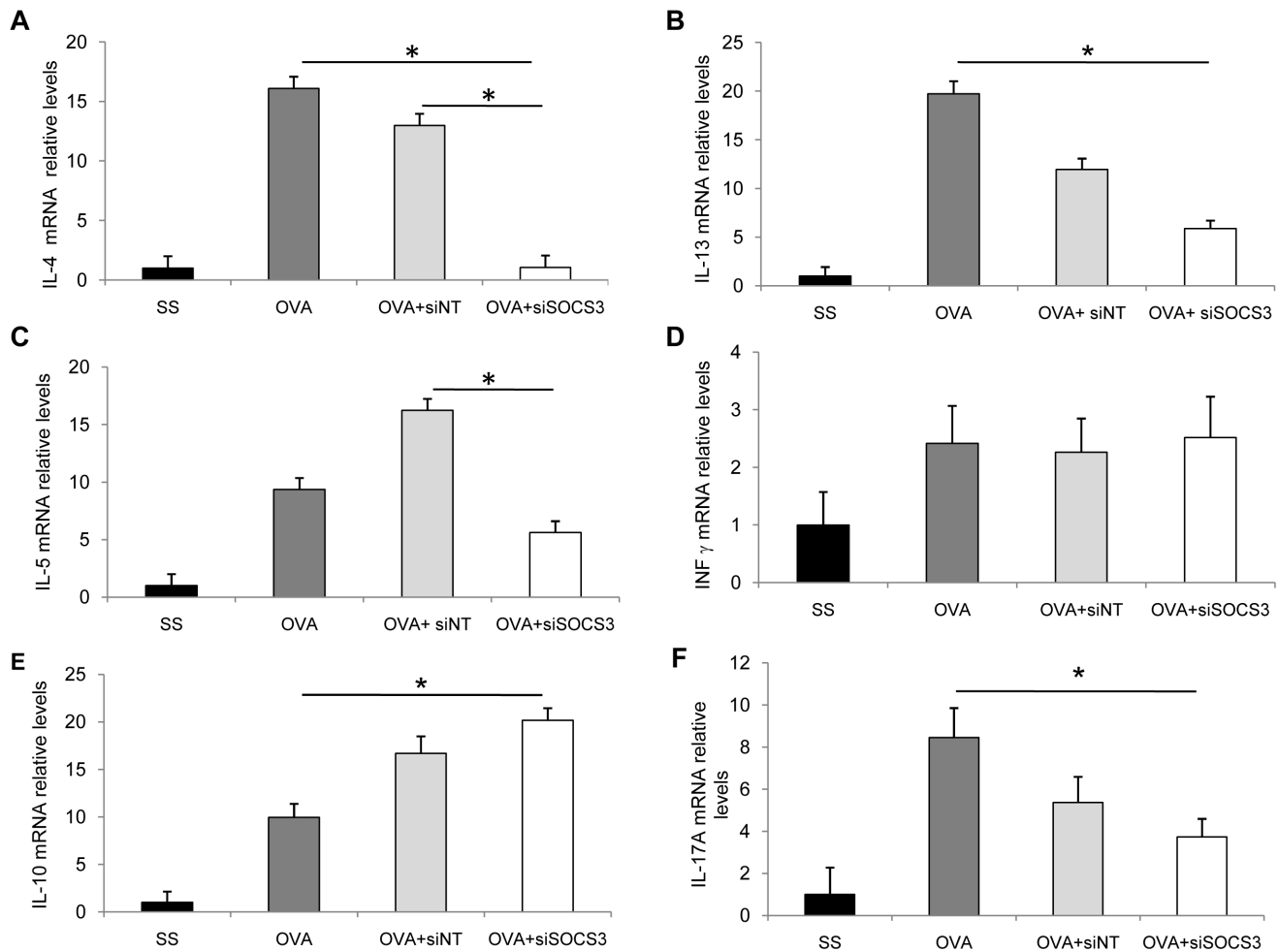


Figure 5. Effect of SOCS3-siRNA therapy on quantitative expression of cytokine genes in lungs. mRNA levels of IL-5 (A), IL-4 (B), IL-13 (C), INF-γ (D), IL-10 (E), and IL-17A in lungs of different groups of mice, measured by real-time quantitative PCR. The results show relative gene expression as determined by the $\Delta\Delta C_t$ method. SS group (mean \pm SD, n = 13); OVA group (mean \pm SD, n = 12); OVA siNT- treated group (mean \pm SD, n = 12); and OVA siSOCS3-treated group (mean \pm SD, n = 15). Significant differences for IL-5 and IL-4 ($P < 0.05$) expression levels were obtained for OVA SOCS3-siRNA vs OVA and OVA siNT groups. For IL-13, IL-10, and IL-17A, significant differences were achieved only between the OVA and OVA SOCS3-siRNA groups ($*P < 0.05$ between groups). doi:10.1371/journal.pone.0091996.g005

asthma mouse model using microarray analysis. Table 2 displays all the miRNAs affected after SOCS3-siRNA therapy. The comparison of OVA and OVA siNT versus the OVA siSOCS3 group shows a total of 25 miRNAs that are down-regulated in the asthmatic treated groups (first column), while 11 miRNAs were augmented due to the treatment (second column).

Discussion

The present study provides new insights in asthma therapy. We have developed and successfully tested an intranasally delivered siRNA therapy in an OVA-induced mouse model of chronic asthma. Transient knockdown of SOCS3 by naked siRNA in chronic asthmatic mice has led to a decrease in lung eosinophilia, as well as a significant reduction of AHR and mucous in the airways, therefore improving chronicity and remodelling.

The inhibition of airway alteration is measured as a reduction in cellular infiltration, goblet cell hyperplasia, and matrix deposition. A histologic analysis of the airways after SOCS3 silencing revealed a diminished perialveolar and peribronchial cellular infiltration and a conserved structure in the airway epithelium.

In our model of asthma SOCS3-siRNA treatment produce also a decreased expression in IL-5, IL-13, and IL-4. This indicates that the therapy directly regulates the Th2 differentiation rate. It is well known that IL-5 actively participates in promoting eosinophil infiltration to the airways, so it is not surprising that after silence therapy IL-5 gene expression in lungs mice was reduced and this correlated with a decreased of eosinophil numbers.

After chronic OVA challenge, IL-4 mRNA levels are dramatically up-regulated in the lungs, as well as in splenocyte cultures stimulated with the OVA antigen (see Figure S4). Once in the airways, IL-4 has the capacity to induce IgE isotype switching and increase mucous production by airway epithelial cells. Moreover, IL-4 is one of the key cytokine regulating the differentiation to the Th2 phenotype. Similarly, we have found high levels of IL-13 in the airways of asthmatic mice. This IL has been traditionally related to an increase in AHR [17]. There have been many efforts to find inhibitors of these 2 cytokines, but the outcomes have yet to fulfill expectations. Kasaian et al. has recently published a therapy in which a dual IL-4/IL-13 antagonist reduces lung inflammation, AHR and IgE production in an OVA-induced asthma murine

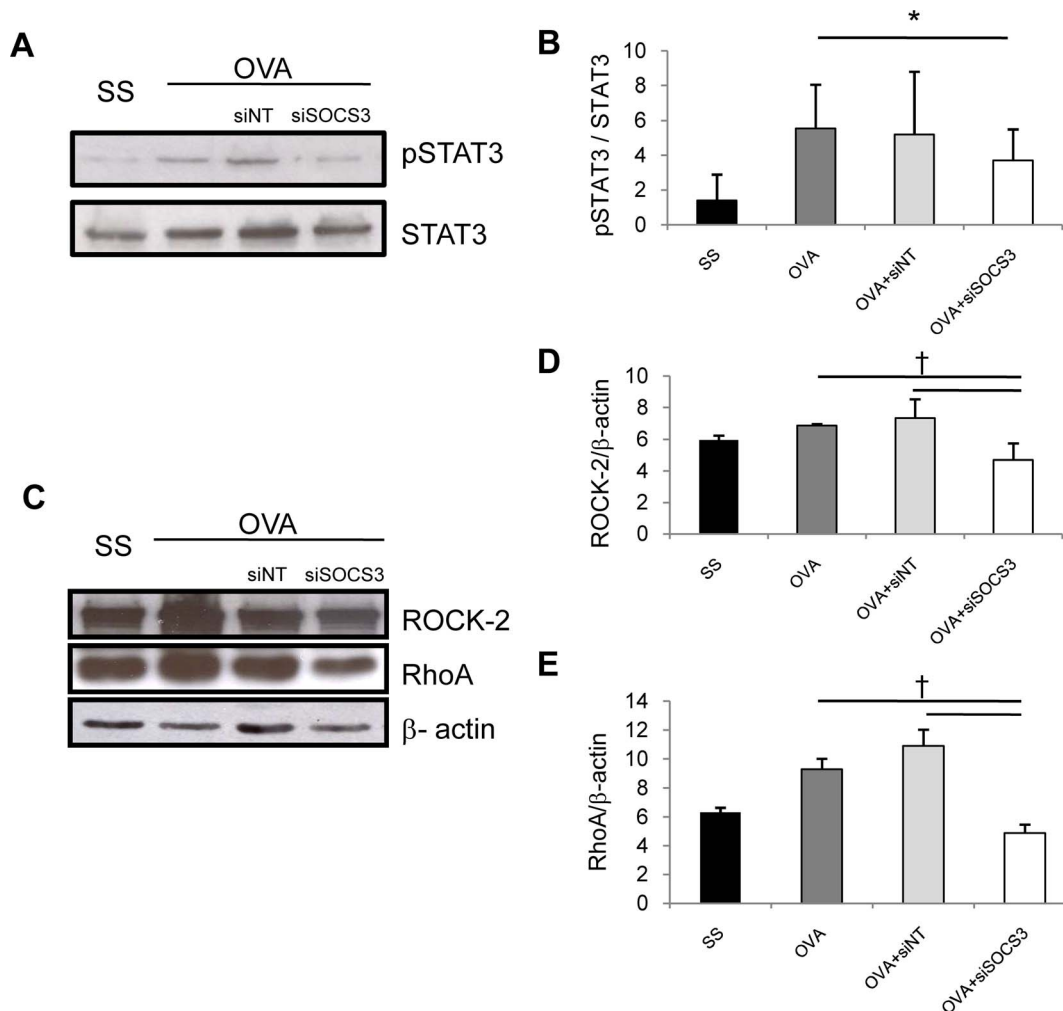


Figure 6. Signaling routes modified after SOCS3-siRNA therapy. Total lung proteins from mice for all the study groups were isolated and Western blot analyses were performed to measure p-STAT3, RhoA, and ROCK-2 activation. pSTAT3 expression was measured against total STAT3 protein (A) and densitometric quantified (B). ROCK-2 and RhoA expression were detected and normalized against β -actin protein (C). Band densitometries were performed to quantified protein of ROCK-2 (D) and RhoA (E). SS group (mean \pm SD, n=13); OVA group (mean \pm SD, n=12); OVA siNT-treated group (mean \pm SD, n=12); and OVA siSOCS3-treated group (mean \pm SD, n=15). $\dagger P < 0.01$ between groups and $* P < 0.05$ between groups.

doi:10.1371/journal.pone.0091996.g006

model [18]. Interestingly, SOCS3 knockdown down-regulated IL-4 and IL-13 in our experimental model, thus leading to an improvement in AHR parameters and reducing specific IgE production.

Another novel finding in this work is the reduction observed in the RhoA/Rho-kinase signaling pathway after SOCS3 silencing. In animal models of allergic bronchial asthma it has been shown that RhoA mediates the augmentation of bronchial smooth muscle contractility, which is one of the causes of AHR. Recently, ROCK has been involved in the regulation of allergic inflammation [19]. In fact, ROCK inhibitors have been tested as potential treatments for AHR in asthma [20]. Moreover, it has been described that IL-13 as well as IL-4 augment bronchial smooth muscle contractility with an up-regulation of RhoA protein, in the case of IL-4 probably through STAT6 activation [21–24]. With our treatment, we have reduced both cytokines and thus we have controlled the smooth muscle activation and therefore AHR.

It is known that eosinophils are a potential source of IL-17 within asthmatic airways [25], and although IL-23 and IL-17 cells

induce Th17-cell-mediated neutrophilic airway inflammation, it has also been reported that cells producing these interleukins also up-regulate Th2 cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice [26]. According to this data, we have detected elevated IL-17A levels in asthmatic mice lungs; these levels reverted with the SOCS3 silencing treatment. At the same time, an increase in IL-10 expression in lungs was achieved in SOCS3-siRNA treated group. These results clearly point to SOCS3 as a modulator of the IL-10/IL-17 regulatory axis.

SOCS3 deficiency in T helper cells resulted in constitutive STAT3 activation, which in turn enhances TGF β 1 and IL-10 production [27]. In our model we have reduced STAT3 phosphorylation after SOCS3 silencing and elevated IL-10 production. This reduced phosphorylation is probably due to we did not abrogate SOCS3 levels completely. In this way, our therapy is focused on resetting the natural regulation process executed by the suppressor to restore the normal phosphorylation levels of the intermediates, in this case STAT3. Supporting this idea, there is a study that states that local inhibition of the

Table 2. List of significantly modulated miRNAs after SOCS3 siRNA therapy compared to the non-treated asthmatic groups ($P<0.05$), and their respective fold induction (FI).

| Downregulated* | | Upregulated† | |
|-----------------|-------|--------------|-------|
| miRNA | FI | miRNA | FI |
| miR-17 | 2,153 | miR-466g | 0,448 |
| miR-674 | 2,032 | miR-1935 | 0,459 |
| miR-25 | 2,069 | miR-1247 | 0,269 |
| miR-195 | 2,917 | miR-705 | 0,431 |
| miR-497 | 2,034 | miR-5107 | 0,467 |
| miR-199b | 2,4 | miR-3104 | 0,467 |
| miR-146b | 2,527 | miR-1224 | 0,481 |
| miR-1839 | 2,234 | miR-130a | 0,376 |
| miR-122 | 3,099 | miR-1949 | 0,422 |
| miR-106b | 2,655 | miR-200b | 0,494 |
| miR-152 | 2,589 | miR-1247 | 0,464 |
| miR-10a | 3,042 | | |
| miR-199a | 5,802 | | |
| miR-200a | 2,105 | | |
| miR-30b | 2,81 | | |
| miR-199a1 | 2,948 | | |
| miR-126 | 2,26 | | |
| miR-182 | 2,2 | | |
| miR-184 | 2,365 | | |
| miR-181c | 3,317 | | |
| miR let-7d-star | 2,74 | | |
| miR-1964 | 2,112 | | |
| miR-665 | 2,682 | | |
| miR-3098 | 2,252 | | |
| miR-671 | 2,136 | | |

*miRNAs downregulated in the siRNA SOCS3-treated group.

†miRNAs upregulated in the siRNA SOCS3-treated group.

doi:10.1371/journal.pone.0091996.t002

STAT-3/STAT-5/SOCS3 dependent feedback loop has been shown to suppress experimental allergic asthma [28].

The major advantage of using naked siRNA is simplicity, as there is no longer cause for concern about the toxicity and inflammatory responses associated with certain delivery vectors. In addition, given intranasally, siRNA is a non-invasive and natural means of delivering therapeutic agents into the lungs. Naked siRNA targeting has been shown to be successful in inhibiting viral lung infection in mouse [29] and rhesus macaque [30]. In fact, a human clinical trial currently in phase II is using this route to deliver siRNA for the treatment of human RSV infection [31].

We have previously demonstrated that eosinophils are one of the major SOCS3-producing cells (7). We have also observed a correlation between BAL eosinophils and SOCS3 expression ($r = 0.97$, $P < 0.05$). Targeting SOCS3 in the airways, where there is a massive eosinophil presence, may be an important mechanism of eosinophil reduction by inhibiting their recruitment to the airways.

MicroRNA-driven RNA interference is a newly recognized and evolutionary conserved regulatory mechanism [32]. We have used microarray analysis to determine miRNAs expression profiles in our chronic asthmatic mice after SOCS3-siRNA therapy. miRNA

modulated by transient SOCS3 knock-down provide information about regulations operated at a posttranscriptional level. Moreover, 2 of the miRNA that appeared downregulated after the SOCS3-siRNA therapy (miR-146b and 126) have been previously involved in asthma disease [32,33]. It would be worthwhile to conduct further studies of the mechanisms involved in the regulation of those miRNAs and others we have found.

Using fluorescence molecular tomography (FMT), we have obtained visual discrimination, measurement, and quantification of asthma progression and have seen how our therapeutic response has evolved in vivo. Quantification of the cathepsin-activated ProSense 680 signal provides a noninvasive measure of pulmonary eosinophilia due to specific protease activation of ProSense by eosinophils [34]. Moreover, FMT results have been further corroborated by conventional, invasive techniques and ex vivo measurements. In addition, X-ray computed tomography has provided structural and anatomical lung information about the chronicity in asthma, showing higher density regions in lungs where the inflammatory process is taking place. These brighter areas associated with fluid accumulation were reduced after SOCS3-siRNA therapy. All together, these 2 new techniques allow us to non-invasively and longitudinally visualize and quantify inflammation in the lung and monitor therapeutic efficacy in vivo.

The advantages of our therapy are that it is easier to administer and it is delivered locally unlike in the Moriwaki et al. study [11], in which SOCS3 was downregulated in T cells *in vitro* and then adoptively transferred to mice). Furthermore, as in T cells and eosinophils, other cells in the airways are probably over-expressed SOCS3, and our therapy allows the siRNA to be taken up by other cells in the airways, thus increasing their effectiveness. These two different approaches have lead to different results. Thankfully to the local therapy, the siRNA has the ability to down regulate SOCS3 in the whole lung environment; thus, we have obtained reduced levels of IL17A mRNA and in turn, increased expression of IL-10. However, the T cell treatment with SOCS3 siRNA reported by Moriwaki et al. produced increased IL17 levels in BAL fluids.

In conclusion, we have demonstrated using different in vitro and in vivo techniques that SOCS3-siRNA intranasal delivered in a chronic asthma mouse model leads to inhibited asthmatic responses. These results may hold therapeutic potential for asthma patients.

Supporting Information

Figure S1 SOCS1 mRNA relative levels are not altered by local SOCS3-siRNA treatment in lungs.

(TIF)

Figure S2 SOCS3 gene expression in liver after intranasal SOCS3-siRNA delivering.

(TIF)

Figure S3 SOCS3 gene expression in spleen after intranasal SOCS3-siRNA delivering.

(TIF)

Figure S4 OVA treatment up regulates IL-4 expression in culture splenocytes from mice previously OVA immunized.

(TIF)

Acknowledgments

The authors recognize Oliver Shaw for his revision and editing in English.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MPZ VDP. Performed the experiments: MPZ VS AZ IB CM JZ CG ARM. Analyzed the data: CM JRC JZ MPZ VDP. Wrote the paper: MPZ VDP JRC.

References

- Holgate ST (2012) Innate and adaptative immune responses in asthma. *Nat Med* 18(5): 673–83.
- Lopez E, Del Pozo V, Miguel T, Sastre B, Seoane C, et al. (2006) Inhibition of chronic airway inflammation and remodeling by galectin-3 gene therapy in a murine model. *J Immunol* 176:1943–1950.
- Yoshimura A, Naka T, Kubo M (2007) SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7(6):454–65.
- Yoshimura A, Suzuki M, Sakaguchi R, Hanada T, Yasukawa H (2012) SOCS, inflammation, and autoimmunity. *Front Immunol* 3:20.
- Lu Y, Fukuyama S, Yoshida R, Kobayashi T, Sacki K, et al. (2006) Loss of SOCS3 gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *J Biol Chem* 281: 36683–36690.
- Madonna S, Scarponi C, De Pita O, Albanesi C (2008) Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IFN- γ inflammatory signaling in human keratinocytes by sustaining ERK1/2 activation. *FASEB J* 22: 3287–3297.
- Lopez E, Zafra MP, Sastre B, Gamez C, Fernandez-Nieto M, et al. (2011) Suppressors of cytokine signaling 3 expression in eosinophils: regulation by PGE₂ and Th2 cytokines. *Clin Dev Immunol* doi: 10.1155/2011/917015.
- Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, et al. (2003) SOCS3 regulates onset and maintenance of Th2-mediated allergic responses. *Nat Med* 9:1047–1054.
- Arakawa S, Hatano Y, Katagiri K (2004) Differential expression of mRNA for Th1 and Th2 cytokine-associated transcription factors and suppressors of cytokine signaling in peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 135:505–510.
- Horiuchi Y, Bae SJ, Katayama I (2006) Overexpression of the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in severe atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 31:100–104.
- Moriwaki A, Inoue H, Nakano T, Matsunaga Y, Matsuno Y, et al. (2011) T cell treatment with small interfering RNA for suppressor of cytokine signaling 3 modulates allergic airway responses in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44(4): 448–55.
- Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S (2005) Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11(1):50–5.
- Bonifazi P, D'Angelo C, Zagarella S, Zelante T, Bozza S, et al. (2010) Intranasally delivered siRNA targeting PI3K/Akt/mTOR inflammatory pathways protects from aspergillosis. *Mucosal Immunol* 3(2):193–205.
- Miyamoto S, Hattori N, Senoo T, Onari Y, Iwamoto H, et al. (2011) Intra-airway administration of small interfering RNA targeting plasminogen activator inhibitor-1 attenuated allergic asthma in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L908–L916.
- Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, et al. (1997) Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 766–755.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408.
- Manuyakorn W, Howarth PH, Holgate ST (2013) Airway remodeling in asthma and novel therapy. *Asian Pac J allergy Immunol* 31(1):3–10.
- Kasaian MT, Marquette K, Fish S, DeClercq C, Agostinelli R, et al. (2013) An IL-4/IL-13 dual antagonist reduces lung inflammation, airway hyperresponsiveness, and IgE production in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49(1):37–46.
- Zhu M, Liu P, Kasahara DI, Williams AS, Verboet NG, et al. (2011) Role of Rho kinase isoforms in murine allergic airway responses. *Eur Respir J* 38(4): 841–850.
- LoGrasso PV, Feng Y (2009) Rho kinase (ROCK) inhibitors and their application to inflammatory disorders. *Curr Top Med Chem* 9(8):704–23.
- Chiba Y, Todokori M, Misawa M (2010) Interleukin-4 upregulates RhoA protein via an activation of STAT6 in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacol Res* 61(2):188–92.
- Chiba Y, Nakazawa S, Todokori M, Shinozaki K, Sakai H, et al. (2009) Interleukin-13 augments bronchial smooth muscle contractility with an up-regulation of RhoA protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:159–67.
- Chiba Y, Matsusue K, Misawa M (2010) RhoA, a possible target for treatment of airway hyperresponsiveness in bronchial asthma. *J Pharmacol Sci* 114(3):239–47.
- Goto K, Chiba Y, Matsusue K, Hattori Y, Maitani Y, et al. (2010) The proximal STAT6 and NF- κ B sites are responsible for IL-13 and TNF- α -induced RhoA transcriptions in human bronchial smooth cells. *Pharmacol Res* 61(5): 466–72.
- Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, et al. (2001) IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblast to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 108 (3):430–38.
- Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Shin-Ichiro K, Suto A, et al. (2008) IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 178:1023–38.
- Kinjo I, Inoue H, Hamano S, Fukuyama S, Yoshimura T, et al. (2006) Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor- β 1. *JEM* 203(4):1021–31.
- Hausding M, Tepe M, Übel C, Lehr HA, Röhrig B, et al. (2010) Induction of tolerogenic lung CD4⁺ T cells by local treatment with a pSTAT-3 and pSTAT-5 inhibitor ameliorated experimental allergic asthma. *Int Immunol* 23(1):1–15.
- Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S (2005) Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11(1):50–5.
- Li BJ, Quinguan T, Cheng D, Qin C, Xie FY, et al. (2005) Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med* 11(9): 441–51.
- DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, et al. (2010) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *PNAS* 107(19): 8800–05.
- Collison A, Herbert C, Siegle JS, Mattes J, Foster PS, et al. (2011) Altered expression of microRNA in the airway wall in chronic asthma: miR-126 as a potential therapeutic target. *BMC Pul Med* doi:10.1186/1471-2466-11-29.
- Garbacki N, Di Valentin E, Huynh-Thu VA, Geurts P, Irrthum A, et al. (2011) MicroRNAs profiling in murine models of acute and chronic asthma: a relationship with mRNAs targets. *PLoS One* doi:10.1371/journal.pone.0016509.
- Korideck H, Peterson JD (2009) Noninvasive quantitative tomography of the therapeutic response to dexamethasone in ovalbumin-induced murine asthma. *JPET* 329:882–89.